



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DEL ESTRÉS
REPLICATIVO INDUCIDO POR LA INHIBICIÓN DE LA
MEVALONATO DIFOSFATO DESCARBOXILASA**

Covadonga Martín Sánchez

Madrid, 2012



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DEL ESTRÉS
REPLICATIVO INDUCIDO POR LA INHIBICIÓN DE LA
MEVALONATO DIFOSFATO DESCARBOXILASA**

Memoria de tesis para optar al grado de Doctor presentada por la licenciada en Biología
Covadonga Martín Sánchez

Director de la Tesis
Miguel Ángel Lasunción Ripa

Jefe del Servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal y Profesor Asociado de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá. Miembro del CIBER Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBERObn)

Este trabajo ha sido realizado en el
Servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal de Madrid

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación obtenida a través de una beca de la Sociedad Española de Arteriosclerosis, las ayudas para investigación SAF2008-01104 y SAF2011-29951 del Gobierno de España y un contrato del CIBERobn (una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III).

A mis abuelos

A mi tío Pepín, una persona irremplazable

*A mis padres, mi hermana Ángela e Ibai, por
vuestra paciencia y apoyo incondicional*

“Yo no tengo mérito, pues he hecho en la vida lo que más me gustaba: la investigación”

*Severo Ochoa (1905-1993)
Premio Nobel de Fisiología y Medicina*

AGRADECIMIENTOS

“Nadie dijo que fuera fácil”. Esta es la frase que más veces me he repetido a lo largo de estos últimos meses, y muchas otras en los últimos años. Efectivamente, el camino hasta aquí no ha sido siempre fácil, pero gracias a las personas que menciono a continuación, siempre ha sido llevadero.

Intentaré ser breve pero no quiero dejarme a nadie.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Miguel Ángel Lasunción, director de esta tesis y en muchas ocasiones profesor y psicólogo. Gracias por tu paciencia, tu dedicación y, sobre todo, por confiar y apostar por mí cuando tuviste que hacerlo. Espero haber sabido devolver esa confianza con mi trabajo. Gracias por todo lo que me has enseñado a lo largo de estos años, ha sido un privilegio trabajar contigo.

Al Dr. Diego Gómez-Coronado por abrirme las puertas a este mundo de la Investigación que me enganchó desde el principio. Gracias por aquella primera visita al departamento y por dirigir el proyecto de fin de carrera, por preocuparte durante todos estos años por cómo me iban las cosas y ofrecerme tu ayuda en todo momento.

A la Dra. Rebeca Busto por su constante interés en mi trabajo. Gracias por todas las veces que has resuelto mis eternas dudas sobre los westerns, las inmunos o cualquier otro protocolo; por estar siempre pendiente y por tu enorme ayuda especialmente en los últimos meses.

Al Dr. Javier Martínez-Botas por echarme una mano con los primers y demás temas “genéticos”, por los artículos interesantes y por la cantidad de veces que me has resuelto dudas informáticas.

A la Dra. Antonia Martín por preocuparse siempre por nosotras, por si estamos bien o estamos mal. Gracias por recordarme que debo estar tranquila.

A Paquita, futura Dra. Cerrato, por escuchar nuestras cosas y prestarles tanta atención. Gracias por la cantidad de veces que me has preguntado si me iba bien, por escucharme y aconsejarme.

A Gema, por TODO (así, en mayúsculas). Gracias por la inmensa ayuda que he recibido por tu parte, ya sabes que no habría podido terminar sin ti. Gracias por el apoyo logístico y moral. Es admirable tu capacidad de trabajo y más aun como eres como persona.

A “las niñas del array”, Lorena, Vero y M^a Eugenia. Gracias chicas por todos estos años en los que venir a trabajar ha sido tan llevadero. Gracias por vuestra preocupación, no solo en los aspectos profesionales sino también en los personales. Gracias por el apoyo moral y por los ratos tan divertidos que hemos pasado y que espero que sigamos pasando. Gracias por mostrarme ese maravilloso mundo de lobos y vampiros...

A M^a Emilia por echarme una mano siempre que lo necesito. Gracias por el apoyo durante esta última etapa que empezamos a rodar juntas y en la que me adelantaste casi, casi, en la primera curva... Lo conseguimos!

A Alberto, por mil cosas. Gracias por estar siempre ahí, por saber cuando estaba agobiada y ofrecerte a echarme una mano. Gracias por todo lo que me has enseñado de ciencia y de otras muchas cosas. Gracias por los chistes y los ratitos tan divertidos que nos hemos pasado hablando de fútbol y otras cosas importantes...

A Lidia, en quien buscaba una compañera de trabajo y encontré una amiga. Gracias por aquellas tardes eternas en el laboratorio en las que siempre había un hueco para un café (o Cola-Cao) y charlar. Espero que las tardes de cine, los partidos en el Bernabéu y los monólogos se repitan muchas veces. Quien sabe, quizá el futuro nos vuelva a juntar en algún laboratorio.

A todas las personas que integran el equipo de Investigación-Bioquímica: a los que están en nuestro laboratorio: Gely, Lidia, Mila y Ana, y los que estuvieron: Jana, Nuria, Gema, Adrian, Nestor, Sara B... A Sara por aquellas primeras nociones de citometría que tan útiles me han sido después. Gracias por resolver todas mis dudas sobre replicación y por estar siempre dispuesta a echar una mano. Al Dr. Dávalos por los primeros pasos con el HPLC y la ayuda recibida en los comienzos.

A la Dra. Hazen y todos los miembros del departamento de la Unidad de Biología Celular por prestarme su espacio y su tiempo. Gracias en especial a la Dra. Paloma Fernández por llevar la tutela de esta tesis.

A Jose, por tantísima ayuda. Por estar siempre dispuesto a colaborar y compartir conmigo tus inmensos conocimientos. Gracias por echarme una mano con la estadística (que ya sabes que me cuesta) y porque la respuesta a cualquier petición de ayuda siempre ha sido un rotundo SI.

A mis chicos: Luis, Fer, Borja, Cho, Iker, Germán, Javi y Santi, porque hacéis de mi vida algo maravilloso. Por estar siempre que os necesito.

A Ire, porque siempre puedo contar contigo. Gracias por el apoyo, el interés constante, los ánimos y por cada llamada y cada mensaje interesándote por mi tesis. Gracias por otras muchas cosas que ya sabes, no sé que haría sin ti.

A la otra “coplas”, Wisi, por ser como eres y porque siempre me arrancas una sonrisa.

A mi “hermana mayor”, Lu. Gracias por estar siempre pendiente, por acudir siempre que te necesito y por me entenderme mejor que nadie. Gracias por Jaime y por Alex y la cantidad de días malos que han alegrado sus sonrisas. Gracias a Juanito por el apoyo informático y por todas las veces que me has tendido la mano a lo largo de estos años.

A Ibai, por tu inmensa paciencia y por respetar un trabajo y una dedicación que no siempre has entendido. Gracias por estar ahí, por tu cariño y tu apoyo constante. Gracias por sufrir en silencio mis días malos y por mejorarlos. Gracias por quererme. Gracias por estar en mi vida.

A mi hermana Ángela, por todo lo que aprendo de ti cada día. Gracias por admirarme mucho más de lo que me merezco y por la todas las cosas buenas que has compartido conmigo.

Pero sobre todo, y por encima de todo, mi mas sincero agradecimiento a mis padres. Gracias por vuestro apoyo incondicional, por respetar todas y cada una de mis decisiones, incluso las erróneas. Gracias por enseñarme que el esfuerzo personal y el trabajo constante son las mejores armas. Gracias por un ejemplo impagable. Gracias a mi madre, por enseñarme a no tirar la toalla y a luchar por lo que quiero. Gracias a mi padre por su infinita dedicación y por esas 3 palabras que son como un bálsamo para mi: “bueno, tu tranquila”.

GRACIAS DE TODO CORAZÓN A LOS DOS.

ÍNDICE

ÍNDICE

| | |
|--|------------|
| ABREVIATURAS..... | I |
| RESUMEN..... | III |
| SUMMARY..... | IV |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 EL COLESTEROL..... | 1 |
| 1.1.1. Biosíntesis de colesterol..... | 1 |
| 1.1.1.1. Ruta del mevalonato..... | 5 |
| 1.1.1.2. Patologías asociadas a la biosíntesis de colesterol..... | 7 |
| 1.1.1.3. Inhibidores de la síntesis de colesterol..... | 7 |
| 1.1.2. Regulación de la biosíntesis de colesterol..... | 8 |
| 1.1.2.1. Regulación de la transcripción mediada por esteroides..... | 9 |
| 1.1.2.2. Regulación específica de la HMG-CoA reductasa..... | 13 |
| 1.2 CONTROL DEL CICLO CELULAR..... | 16 |
| 1.2.1. Control de la fase S..... | 17 |
| 1.2.1.1. Papel de las proteínas ATR y Chk1..... | 19 |
| 1.2.1.2. Papel de la proteína γ -H2AX..... | 21 |
| 1.2.2. Papel de las MAPKs en el ciclo celular..... | 23 |
| 1.3 EL COLESTEROL EN LA PROLIFERACIÓN Y EL CICLO CELULAR..... | 26 |
| 1.4 LA PROTEÍNA AMPK. IMPLICACIONES EN EL METABOLISMO DEL | |
| COLESTEROL Y EL CICLO CELULAR..... | 29 |
| 1.4.1. Estructura de AMPK..... | 29 |
| 1.4.2. Acciones de AMPK sobre el metabolismo..... | 30 |
| 1.4.2.1. Regulación de la proliferación y el ciclo celular por AMPK..... | 31 |
| 2. OBJETIVOS..... | 33 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 35 |
| 3.1 REACTIVOS..... | 35 |
| 3.2 MÉTODOS..... | 35 |
| 3.2.1. Cultivos celulares..... | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.2. Marcaje metabólico de los intermediarios de la biosíntesis de colesterol | 37 |
| 3.2.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)..... | 37 |
| 3.2.3. Proliferación celular | 39 |
| 3.2.3.1. Ensayo de exclusión de azul tripan..... | 39 |
| 3.2.3.2. Ensayo colorimétrico XTT | 39 |
| 3.2.3.3. Citometría de flujo..... | 40 |
| 3.2.4. Electroforesis e inmunodetección | 44 |
| 3.2.5. Transfección de células HL-60 con un siRNA | 48 |
| 3.2.6. Inmunodetección de las proteínas intracelulares | 49 |
| 3.2.7. Determinación del contenido celular de ATP | 51 |
| 3.2.8. Estudio de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa en tiempo real | 52 |
| 3.2.9. Análisis estadísticos..... | 54 |
| 4. RESULTADOS | 55 |
| 4.1 EFECTO DEL FLUOROMEVALONATO SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE COLESTEROL | 55 |
| 4.1.1. Estudio de la acumulación de compuestos de la vía del mevalonato | 55 |
| 4.1.2. Efecto sobre la síntesis de esteroides..... | 55 |
| 4.2 EFECTOS DEL FLUOROMEVALONATO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR..... | 57 |
| 4.2.1. Estudio del efecto del fluoromevalonato sobre la proliferación de diferentes líneas celulares (ensayos XTT)..... | 57 |
| 4.2.2. Análisis de la progresión del ciclo celular de células HL-60 tratadas con fluoromevalonato | 59 |
| 4.2.2.1. Análisis del efecto de diferentes dosis de fluoromevalonato y diferentes tiempos de tratamiento | 59 |
| 4.3 IMPLICACIÓN DE LAS DIFERENTES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR EN LOS EFECTOS DEL FLUOROMEVALONATO SOBRE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR..... | 63 |
| 4.3.1. Papel de la ruta de p38 MAPK. Efecto del inhibidor SB 203580..... | 63 |
| 4.3.2. Papel de la ruta de JNK/SAPK. Efecto del inhibidor SP 600125 | 64 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.3. Papel de la ruta de ERK. Efecto del inhibidor PD 98059 | 65 |
| 4.4 ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE DAÑO EN EL ADN EN LAS CÉLULAS TRATADAS CON FLUOROMEVALONATO | 67 |
| 4.4.1. Análisis de la presencia de la proteína γ -H2AX como marcador de daño en el ADN..... | 67 |
| 4.4.2. Análisis del papel de fluoromevalonato sobre la producción de ROS. Efecto de la adición de diferentes compuestos antioxidantes..... | 71 |
| 4.4.3. Implicación de las vías de respuesta al daño en el ADN..... | 73 |
| 4.4.3.1. Papel de las proteínas sensoras ATR/ATM..... | 73 |
| 4.4.3.2. Papel de las proteínas efectoras Chk1 y Chk2..... | 75 |
| 4.4.3.3. Efecto de la inhibición de la vía de ATR-Chk1..... | 77 |
| 4.5 IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE AMPK EN LOS EFECTOS DEL FLUOROMEVALONATO SOBRE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR..... | 92 |
| 4.5.1. Activación de AMPK por efecto de fluoromevalonato | 92 |
| 4.5.2. Cambios en el contenido celular de ATP por efecto de fluoromevalonato | 92 |
| 4.5.2.1. Efecto de la inhibición de la producción de ATP..... | 93 |
| 4.5.3. Estudio de los efectos de la activación y de la inhibición de AMPK sobre el ciclo celular..... | 95 |
| 4.6 IMPLICACIÓN DEL COLESTEROL Y LOS INTERMEDIARIOS DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE COLESTEROL EN EL EFECTO DEL FLUOROMEVALONATO | 100 |
| 4.6.1. Papel del mevalonato y sus derivados isoprenoides no esteroides | 100 |
| 4.6.2. Papel del colesterol | 101 |
| 4.6.3. Inhibición de HMG-CoA reductasa con lovastatina | 104 |
| 4.6.4. Estudio de la expresión del gen <i>HMGR</i> | 106 |
| 4.7 DEFICIENCIA DE DESOXIRIBONUCLEÓTIDOS COMO CAUSA DEL ESTRÉS REPLICATIVO PROVOCADO POR FLUOROMEVALONATO | 108 |
| 5. DISCUSIÓN | 115 |
| 5.1 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN EXPERIMENTAL DE LA ENZIMA MEVALONATO DIFOSFATO DESCARBOXILASA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR | 116 |

| | |
|--|-----|
| 5.1.1. El fluoromevalonato inhibe la proliferación celular | 117 |
| 5.1.2. Los efectos de fluoromevalonato son dependientes de la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa | 120 |
| 5.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LOS EFECTOS DE FLUOROMEVALONATO SOBRE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR..... | 122 |
| 5.2.1. Las vías de señalización de las MAPKs no están implicadas en la parada en fase S provocada por fluoromevalonato..... | 122 |
| 5.2.2. El tratamiento con Fmev produce un estrés replicativo que activa la vía de daño en ADN. Implicación de la vía de ATR-Chk1 en la inhibición del avance a través de S..... | 125 |
| 5.3 EL ESTRÉS REPLICATIVO PROVOCADO POR FLUOROMEVALONATO SE ASOCIA A LA DEFICIENCIA DE ATP PROVOCADA POR LA CONTINUA FOSFORILACIÓN DE MEVALONATO | 132 |
| 5.3.1. Los antioxidantes no revierten el efecto del fluoromevalonato .. | 132 |
| 5.3.2. El tratamiento con fluoromevalonato produce un descenso de la concentración intracelular de ATP que se previene inhibiendo la enzima HMG-CoA reductasa | 132 |
| 5.3.3. El fluoromevalonato conduce a la activación de la vía de AMPK. | 135 |
| 5.3.4. El estrés metabólico producido por la acumulación de mevalonato difosfato conduce a una deficiencia de desoxirribonucleótidos que es responsable del estrés replicativo provocado por fluoromevalonato .. | 139 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 143 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 145 |

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosina difosfato

AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribofuranósido

AMP: adenosina monofosfato

AMPK: proteína quinasa activada por AMP (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase)

ARN: ácido ribonucleico

ATM: ataxia-telangiectasia mutated

ATP: adenosina trifosfato

ATR: ataxia telangiectasia mutated and Rad3- related

BrdU: 5-bromo-2'-desoxiuridina

CDK: quinasa dependiente de ciclina (cyclin dependent kinase)

Chk1: punto de control 1 (checkpoint1)

Chk2: punto de control 2 (checkpoint2)

DCFH₂-DA: diclorofluoresceína diacetato reducida

DMAPP: 3,3-dimetilalil pirfosfato

DMSO: dimetil sulfóxido

dNs: desoxirribonucleósidos

dNTPs: desoxirribonucleótidos

DSB: roturas de doble cadena (double strand breaks)

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FITC: fluoresceína isotiocianato

Fmev: 6-fluoromevalonato

FPP: farnesil dirofosfato

GGPP: geranilgeranil difosfato

GPP: geranil difosfato

HMG-CoA: 3β-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (high performance liquid chromatography)

INSIG: gen inducido por insulina (insulin-induced gene)

IPP: isopentenil difosfato

JNK: quinasa c-Jun N-terminal

LDL: lipoproteína de baja densidad (low density lipoprotein)

LXR: receptor X del hígado (liver X receptor)

MAPK: proteína activada por mitógenos (mitotic activated protein kinase)

MIM: Mendelian Inheritance in Man

MVD: mevalonato 5-difosfato descarboxilasa

mTOR: objetivo de la rapamicina (mammalian target of rapamicyn)

PBS: suero salino tamponado con fosfato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pRB: proteína del retinoblastoma

ROS: especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)

SRE: elemento de respuesta a esteroides (sterol receptor element)

SREBP: proteína de unión al elemento regulado por esteroides (sterol response element binding protein)

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

El requerimiento de colesterol para la proliferación de las células de mamíferos está bien establecido. En nuestro laboratorio se había demostrado que el colesterol era necesario para la correcta transición de la fase G2 a M en el ciclo celular y para la citocinesis. Cuando se tratan con altas dosis de estatinas, inhibidores competitivos de la enzima HMG-CoA reductasa, las células se detienen en la fase G1 por deficiencia de isoprenoides no esteroides. Por tanto, no solo el producto final de la ruta – colesterol - es fundamental para la célula sino que a lo largo del proceso se sintetizan otros compuestos imprescindibles para el correcto desarrollo del ciclo celular. En relación con esto, en el presente trabajo nos propusimos estudiar los efectos sobre la proliferación celular de la inhibición de la enzima mevalonato difosfato descarboxilasa, que cataliza la síntesis de isopentenil difosfato. En células HL-60, hemos demostrado que el tratamiento con un inhibidor específico de la enzima, el 6-fluoromevalonato, produce una inhibición de la proliferación, debida a un retraso del avance a través de la fase S del ciclo celular con inhibición de la síntesis de ADN. Dicha inhibición es el resultado de la acumulación de mevalonato difosfato que actúa como sumidero de fosfato y da lugar a un estrés replicativo provocado en la célula por una deficiencia de ATP que, a su vez, produce un desequilibrio en los niveles de desoxirribonucleótidos disponibles para la célula. Dicho estrés replicativo genera dobles roturas en el ADN y activa la vía de señalización mediada por ATR-Chk1 responsable del bloqueo del ciclo celular. Describimos por primera vez una conexión entre la vía de síntesis de colesterol y la replicación del ADN, pero podría extrapolarse a otras alteraciones metabólicas donde se acumulen metabolitos fosforilados.

SUMMARY

The cholesterol requirement for cell proliferation is well established. In our laboratory it was demonstrated that cholesterol deficiency results in the cell cycle arrest at G2/M and cytokinesis is also impeded. When high doses of statins were used to block HMG-CoA reductase activity, cell cycle was halted at G1 phase due to the deficiency of non-sterols isoprenoids. Therefore, not only the end product of the pathway – cholesterol - is crucial for cells, but other compounds synthesized in the cholesterol pathway also are essential for the correct development of the cell cycle. In line with this, in the present work we studied the effects of mevalonate diphosphate decarboxylase inhibition, the enzyme that catalyzes the synthesis of isopentenyl diphosphate. We have found that treatment with a specific inhibitor of this enzyme activity, 6-fluoromevalonate, leads to the inhibition of cell proliferation due to a delay in the S phase of the cell cycle and inhibition of DNA replication. This effect is the result of mevalonate diphosphate accumulation, which acts as a phosphate sink, that is followed by ATP deficiency and subsequent imbalance in the deoxyribonucleotides pool. As a consequence, a replicative stress is induced as indicated by DNA double strand break formation and the activation of the ATR-Chk1 pathway, which is responsible of cell cycle delay. This is the first description of the link between the cholesterol biosynthesis pathway and DNA replication, but it could be extrapolated to other metabolic disorders where phosphorylated metabolites accumulate.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL COLESTEROL

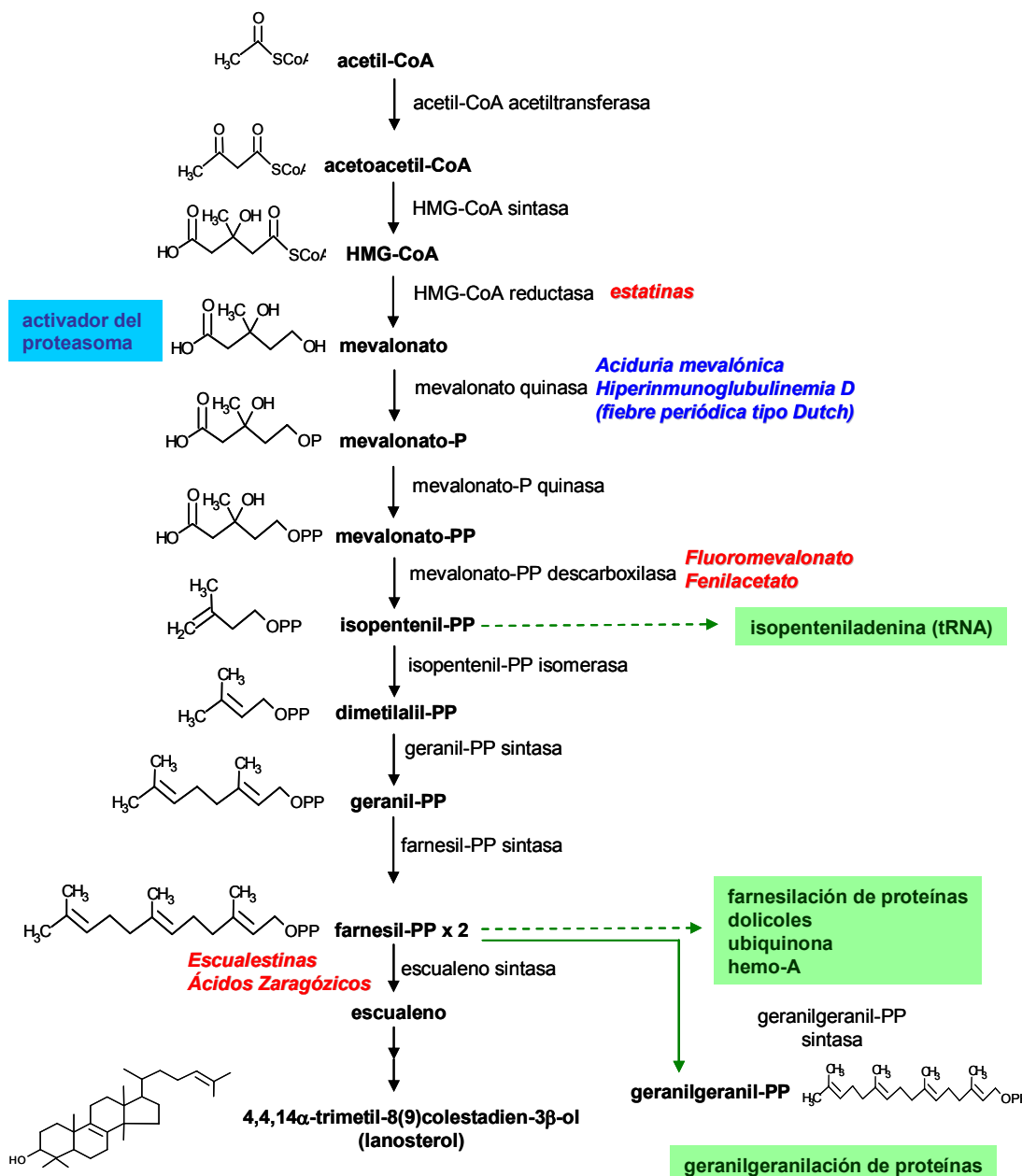
Desde su descubrimiento por M.E. Chevreul a principios del siglo XIX, el colesterol, cuyo nombre procede del griego *koles* (bilis) y *stereos* (sólido), ha sido objeto de intensos estudios que han aportado información en diversos campos. Además de su papel fundamental como componente estructural de las membranas celulares de mamíferos, el colesterol es el precursor de las hormonas esteroídicas, oxisteroles y de los ácidos biliares. Por otro lado, ejerce importantes funciones reguladoras como modulador de proteínas de membrana [1], interviene en procesos de diferenciación celular [2], regula la formación de las sinapsis [3] y es necesario para la progresión del ciclo celular y la proliferación celular en general [4, 5]. Esta implicación en procesos fisiológicos tan diversos, confiere al colesterol un alto interés biológico.

1.1.1. Biosíntesis de colesterol

De forma general las células animales pueden obtener colesterol de dos fuentes: mediante la captación de lipoproteínas de la circulación sanguínea a través de receptores, o mediante la síntesis endógena a partir de acetil-CoA. Este último proceso consiste en una ruta multienzimática que discurre entre el citoplasma, el retículo endoplásmico y los peroxisomas [6]. A lo largo de esta ruta se sintetizan diversos metabolitos tanto de carácter esteroídico como no esteroídico que son fundamentales para la célula [5]. El proceso comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA dando lugar a acetoacetil-CoA, que se une a una nueva molécula de acetil-CoA generando HMG-CoA por acción de la enzima HMG-CoA sintasa (**Esquema 1**). Este compuesto es reducido a mevalonato por la enzima HMG-CoA reductasa, enzima limitante de la ruta que se encuentra regulada a múltiples niveles y es diana de las estatinas, los fármacos más utilizados para el tratamiento de la hipercolesterolemia.

Después de varios eventos de fosforilación, por acción de la enzima mevalonato difosfato descarboxilasa (MVD) que se localiza en el citosol [7], el mevalonato será

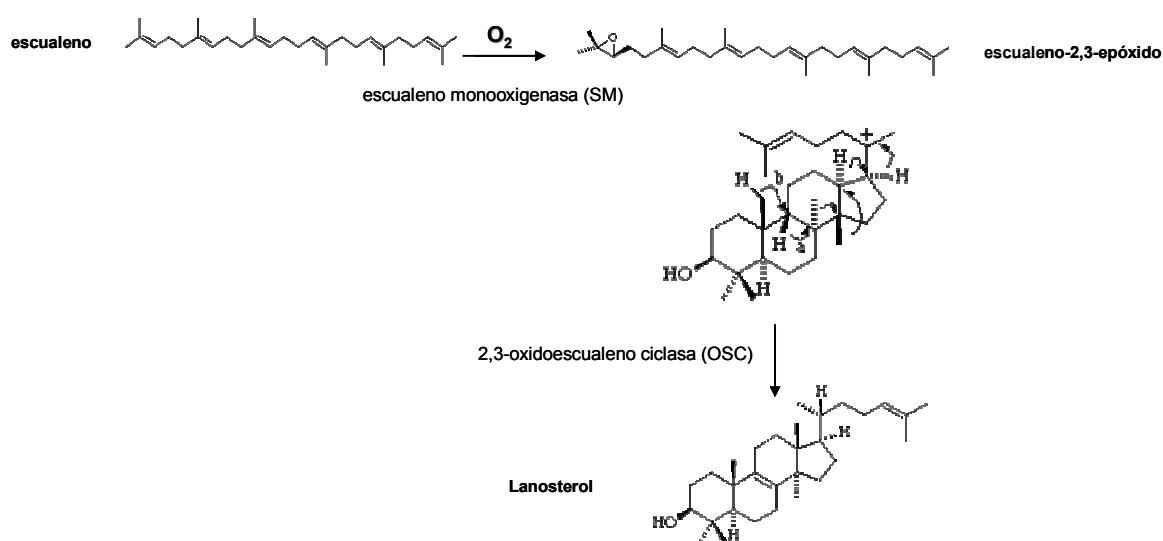
transformado en isopentenil difosfato (IPP), el cual se isomeriza a 3,3-dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Hasta aquí, esta primera parte de la biosíntesis de colesterol se ha denominado “ruta del mevalonato” y dada su relevancia en este trabajo se profundizará sobre ella más adelante.



Esquema 1. Ruta de biosíntesis de colesterol. Síntesis de derivados isoprenoides no esteroides. En color rojo se presentan los compuestos inhibidores junto a las enzimas que inhiben. En color azul las enfermedades asociadas a la deficiencia de la enzima correspondiente.

A continuación ambos isómeros se condensan dando lugar a geranil difosfato (GPP). La molécula de GPP se condensa con otra molécula de IPP para dar

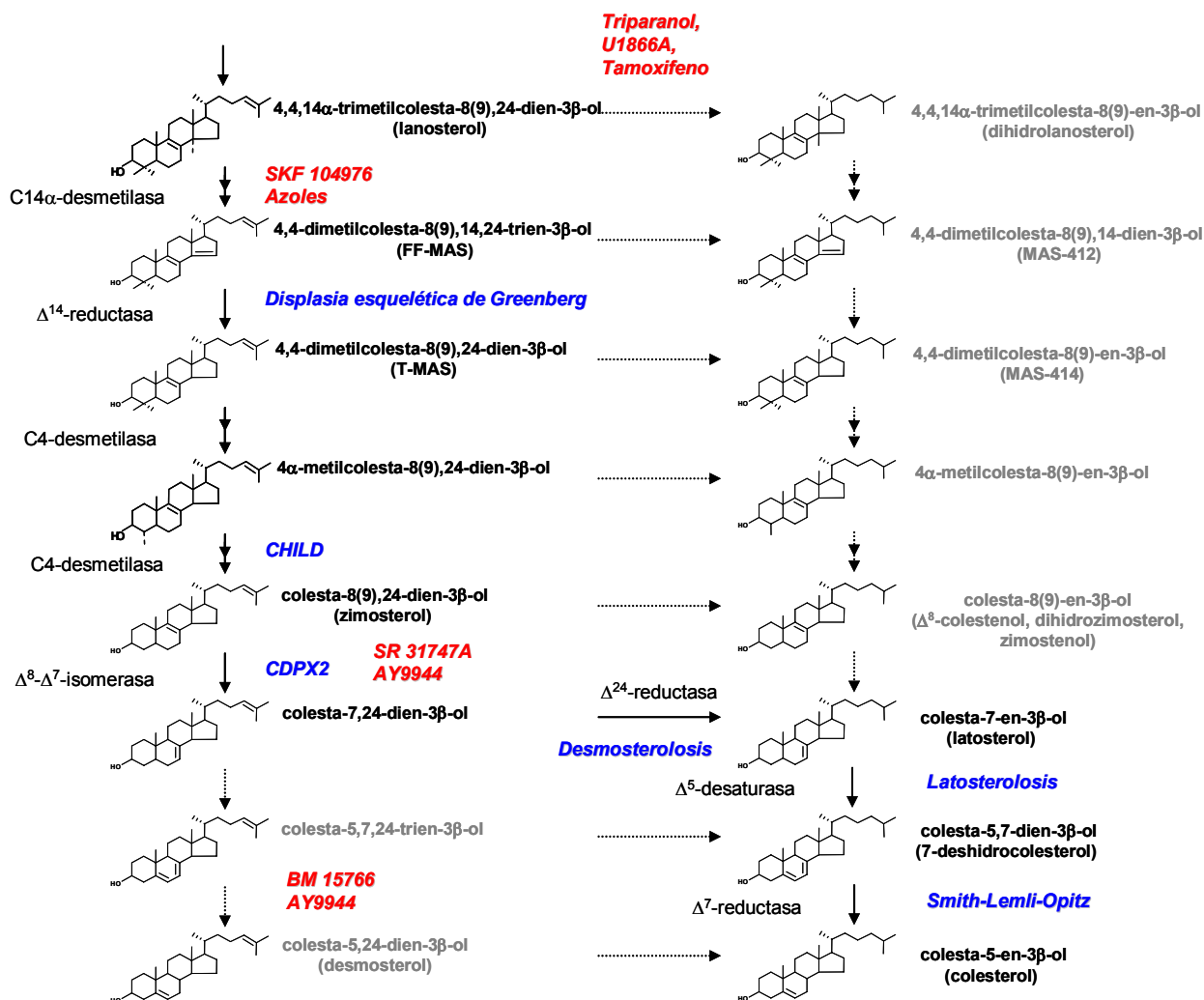
farnesil difosfato (FPP) a partir del que se originan productos no esteroídicos con una gran relevancia en diversos procesos celulares, como se comentará más adelante. La condensación de dos moléculas de FPP da lugar al escualeno, que se cicla formando lanosterol, primer esteroide de la ruta. La ciclación del escualeno viene precedida por la formación de un epóxido (2,3-monoxiescualeno) a cargo de la escualeno monooxigenasa (SM). Esta reacción de oxigenación tiene interés evolutivo pues marca la aparición del oxígeno en la atmósfera. A continuación tiene lugar la ciclación propiamente catalizada por la 2,3-oxidoescualeno ciclasa (OSC) dando lugar al lanosterol (**Esquema 2**).



Esquema 2. Representación de la ciclación del escualeno en presencia de oxígeno y la formación de lanosterol

A partir de la formación de lanosterol, la ruta de biosíntesis de colesterol puede continuar por dos vías: la vía de Bloch, también conocida como “insaturada” por la presencia en todos los componentes de un doble enlace entre C24 y C25 o la vía de Kandutsch-Russell o “saturada”, que se inicia al convertirse en dihidrolanosterol por acción de la esteroide Δ^{24} -reductasa (DHCR24) [8]. (**Esquema 3**). El primer paso de la conversión del lanosterol da lugar al 4,4-dimetilcolesta-8,14,24-trien-3 β -ol (FF-MAS), cuyo C14 se reduce para generar 4,4-dimetilcolesta-8,24-dien-3 β -ol (T-MAS) que, tras varias reacciones, da lugar al desmosterol, último esteroide de la vía insaturada. La reducción del doble enlace en el C24 del desmosterol da lugar al colesterol. Sin embargo, dado que el sustrato por el que

tiene mayor afinidad la DHCR24 es el colest-7,24-dien-3 β -ol, en la mayor parte de los tejidos el precursor inmediato mayoritario del colesterol es el 7-deshidrocolesterol y no el desmosterol.



Esquema 3. Representación esquemática de la síntesis de esteroides en la ruta de biosíntesis de colesterol. En color rojo se presentan los inhibidores junto a la enzima a la que actúan. El color azul las diferentes patologías asociadas a deficiencias en la enzima a la que acompañan.

Algunos de estos intermediarios esteroídicos juegan papeles importantes en la fisiología celular. Así, el FF-MAS y el T-MAS (*“follicular fluid meiosis activating sterol”* y *“testicule meiosis activating sterol”*, respectivamente) estimulan la meiosis en gónadas. FF-MAS, por ejemplo, promueve la transición de metafase I a metafase II en oocitos in vitro, facilitando la maduración de los mismos [9]. En consonancia con ello, la actividad de la lanosterol 14 α -desmetilasa, que permite la síntesis de

estos compuestos, varía a lo largo de la gametogénesis [10]. Otro ejemplo es el del esterol intermediario inmediatamente anterior al colesterol, el 7-deshidrocolesterol, que es también precursor de vitamina D₃.

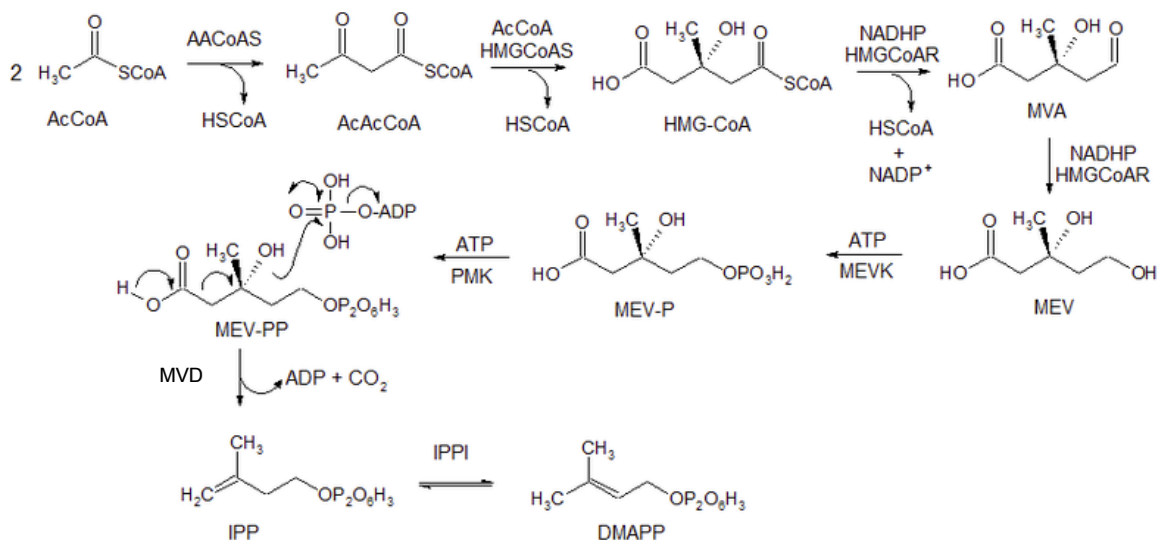
Por otra parte, en lo que puede considerarse una derivación de la ruta, la escualeno monooxigenasa puede incorporar un segundo átomo de oxígeno a MOS generando diepoxiesqualeno (DOS), el cual sufre la acción de la OSC dando lugar a 24(S),25-epoxilanoesterol. A través de las reacciones de la colesterogénesis, el epoxilanoesterol es transformado finalmente en 24,25 epoxicolesterol, que es un potente activador del receptor nuclear LXR (“liver receptor X”) [11].

1.1.1.1. Ruta del mevalonato

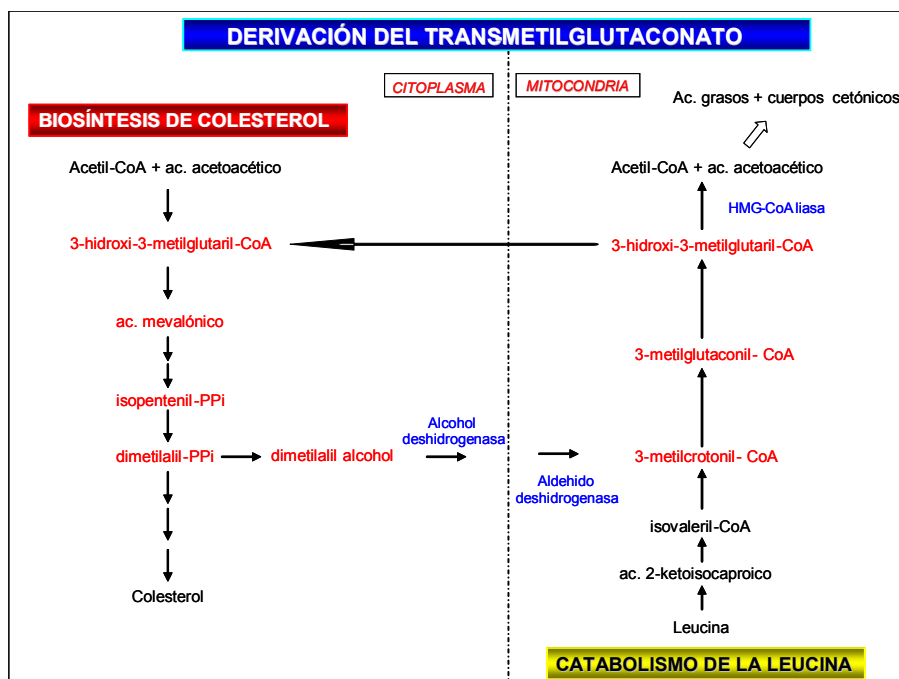
La ruta del mevalonato- que se detalla en el **Esquema 4**- es prácticamente universal y se lleva a cabo en el citosol. Esta ruta da lugar a la síntesis de diversos isoprenoides con gran importancia biológica pues su papel no se limita al de ser intermediarios de la biosíntesis de colesterol y además no pueden ser sustituidos por este último en sus funciones. Así por ejemplo, el mevalonato actúa como activador selectivo del proteasoma, complejo enzimático que se encarga de degradar proteínas [12]. El IPP se utiliza para sintetizar isopentenil adenina, base que forma parte de algunos ARN de transferencia [13]. La condensación de una nueva molécula de IPP al FPP da lugar al geranilgeranil difosfato (GGPP). Tanto el FPP como el GGPP se utilizan para la prenilación de determinadas proteínas, como Rho y Ras, [14], modificación postraducciona que les permite anclarse en las membranas y ejercer sus funciones [15]. A partir de FPP también se forman el grupo hemo A y la ubiquinona, que participan en el transporte de electrones, y los dolicoles, que participan en la N-glicosilación de proteínas [8].

Existe una vía alternativa de metabolización del 3,3-dimetilalil-difosfato, denominada “derivación del transmetilglutaconato” (**Esquema 5**), a través de la cual una cierta proporción (del orden del 20%) del 3,3-dimetilalil-difosfato es transformado a trans-3-metilglutaconatil-CoA, y éste a HMG-CoA, que reiniciaría el proceso. Esta derivación, que aparentemente resulta poco rentable desde el punto de vista energético, puede tener importancia en el control global de la síntesis de colesterol

Para asegurar la constante producción de los múltiples compuestos isoprenoides, a la vez que adaptar la biosíntesis de colesterol a las necesidades cambiantes de la célula, la ruta del mevalonato está sujeta a una fina regulación que responde tanto al producto final – el colesterol – como a otros intermediarios [16].



Esquema 4. Ruta del mevalonato.



Esquema 5. Derivación del trans-metilglutaconato

1.1.1.2. Patologías asociadas a la biosíntesis de colesterol

El estudio de las enfermedades congénitas producidas por deficiencias en las enzimas de la biosíntesis de colesterol nos da una idea de la relevancia de la ruta en la embriogénesis y el desarrollo. Siguiendo el orden de la propia ruta (**Esquema 1** y **Esquema 3**) la primera patología que encontramos es la aciduria mevalónica (MIM 251770), que es debida a la deficiencia de la mevalonato quinasa. El cuadro clínico es muy variable según el grado de la deficiencia. El síndrome de la hiperinmunoglobulemia D o fiebre periódica de tipo Dutch (MIM 260920) también se asocia con una deficiencia de esta enzima aunque de grado menor.

Las siguientes patologías están relacionadas con las enzimas encargadas de la formación de esteroides. La más conocida es el síndrome de Smith-Lemli-Optiz (SLOS; MIM 270400) causada por deficiencia en la esterol Δ^7 -reductasa.

El síndrome de Conradi-Hünemann-Happle (CPDX2; MIM 302960) y el síndrome de CHILD ("congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects", MIM:308050) están causados por deficiencias en la esterol $\Delta^{8,7}$ -isomerasa y en la esterol C-4 desmetilasa (NSDHL), respectivamente [17, 18].

Finalmente mencionemos otras tres patologías de muy baja prevalencia relacionadas con esta ruta metabólica: la desmosterolosis (MIM 602398), que debe su nombre a la acumulación de desmosterol que se produce por la deficiencia de la Δ^{24} -reductasa [19], la displasia esquelética de Greenberg (MIM 215140), que parece estar causada por deficiencias en la Δ^{14} -reductasa [19] y la latosterolosis (MIM 607330), causada por la deficiencia de la Δ^5 -desaturasa [20]. Todas estas anomalías congénitas se acompañan de alteraciones en el desarrollo, con malformaciones, retraso mental y alteraciones cutáneas y esqueléticas, y muchos de los afectados fallecen de forma prematura.

1.1.1.3. Inhibidores de la síntesis de colesterol

El empleo de inhibidores específicos de la biosíntesis de colesterol ha permitido estudiar en profundidad el papel de cada uno de los intermediarios en los diferentes procesos celulares en los que están implicados el colesterol y los componentes de su ruta de biosíntesis (**Esquema 1** y **Esquema 3**).

De todos estos inhibidores cabe destacar las estatinas, análogos estructurales HMG-CoA reductasa, que se emplean para el tratamiento de la

hipercolesterolemia. A dosis terapéuticas las estatinas inhiben la síntesis de mevalonato de forma parcial. El beneficio terapéutico se obtiene debido a que el descenso de la síntesis endógena de colesterol estimula la expresión del receptor de LDL, aumentando de este modo la tasa de eliminación de las lipoproteínas del plasma y disminuyendo su concentración plasmática.

La enzima mevalonato difosfato descarboxilasa es inhibida por fluoromevalonato y por fenilacetato [21, 22]. Los bisfosfonatos nitrogenados, empleados en el tratamiento de la osteoporosis, inhiben la farnesil difosfato sintasa [23] y la escualeno sintasa es inhibida por la escualestinas, entre las que destaca el ácido zaragózico [24].

También se han desarrollado inhibidores de la ruta de los esteroides. El SKF 104976 inhibe la enzima 14α -desmetilasa, llevando a una completa inhibición de la biosíntesis de colesterol y la acumulación de lanosterol y de 24-dihidrolanosterol [4]. Al igual que otros derivados amilados de esteroides que también inhiben esta enzima, el SKF 104976 tiene una alta toxicidad in vivo llegando a desencadenar una respuesta apoptótica en las células. Esto sugiere que la acumulación de lanosterol en el RE es percibida por la célula como una señal de estrés.

La esterol $\Delta^{8,7}$ -isomerasa es inhibida por ciertos ligandos sigma como el haloperidol o el SR31747 [25]. El primero de ellos es empleado en clínica como antipsicótico por sus propiedades como antagonista de los receptores D2 de dopamina.

Respecto a la Δ^7 -reductasa, las moléculas AY9944 y BM15766 actúan como inhibidores no competitivos de la enzima [26]. Su utilización en células de cultivo o en animales conduce a la inhibición de la síntesis de colesterol y la acumulación de 7-deshidrocolesterol.

Por último, la Δ^{24} -reductasa es inhibida por compuestos como el triparanol, el U18666A y el tamoxifeno [27] [28]. Este último es empleado en el tratamiento del cáncer de mama por sus propiedades antiestrogénicas.

1.1.2.Regulación de la biosíntesis de colesterol

Como se ha mencionado anteriormente, las células pueden obtener colesterol de forma exógena, por captación a través de receptores, o sintetizarlo endógenamente. Cada célula debe asegurar un balance de ambos procesos con el

fin de mantener la síntesis de mevalonato y evitar la acumulación de un exceso de colesterol. Este balance se consigue básicamente mediante la regulación coordinada de la HMG-CoA reductasa

(en general, de todas las enzimas de la biosíntesis de colesterol) y el receptor de LDL. Así, cuando la célula detecta una deficiencia de colesterol, se estimula la expresión del receptor de LDL y se mantiene alta la actividad de la HMG-CoA reductasa para sintetizar mevalonato para la producción tanto de colesterol como de productos no esteroides. Sin embargo, ante un exceso de colesterol se reduce la expresión de ambas proteínas aunque se mantiene una pequeña actividad de la HMG-CoA reductasa para garantizar que las células produzcan los isoprenoides necesarios [29]. Si se proporciona a las células un exceso de mevalonato junto con LDL como fuente de colesterol, la actividad residual de la HMG-CoA reductasa desaparece y la producción de mevalonato termina [29, 30].

1.1.2.1.Regulación de la transcripción mediada por esteroides

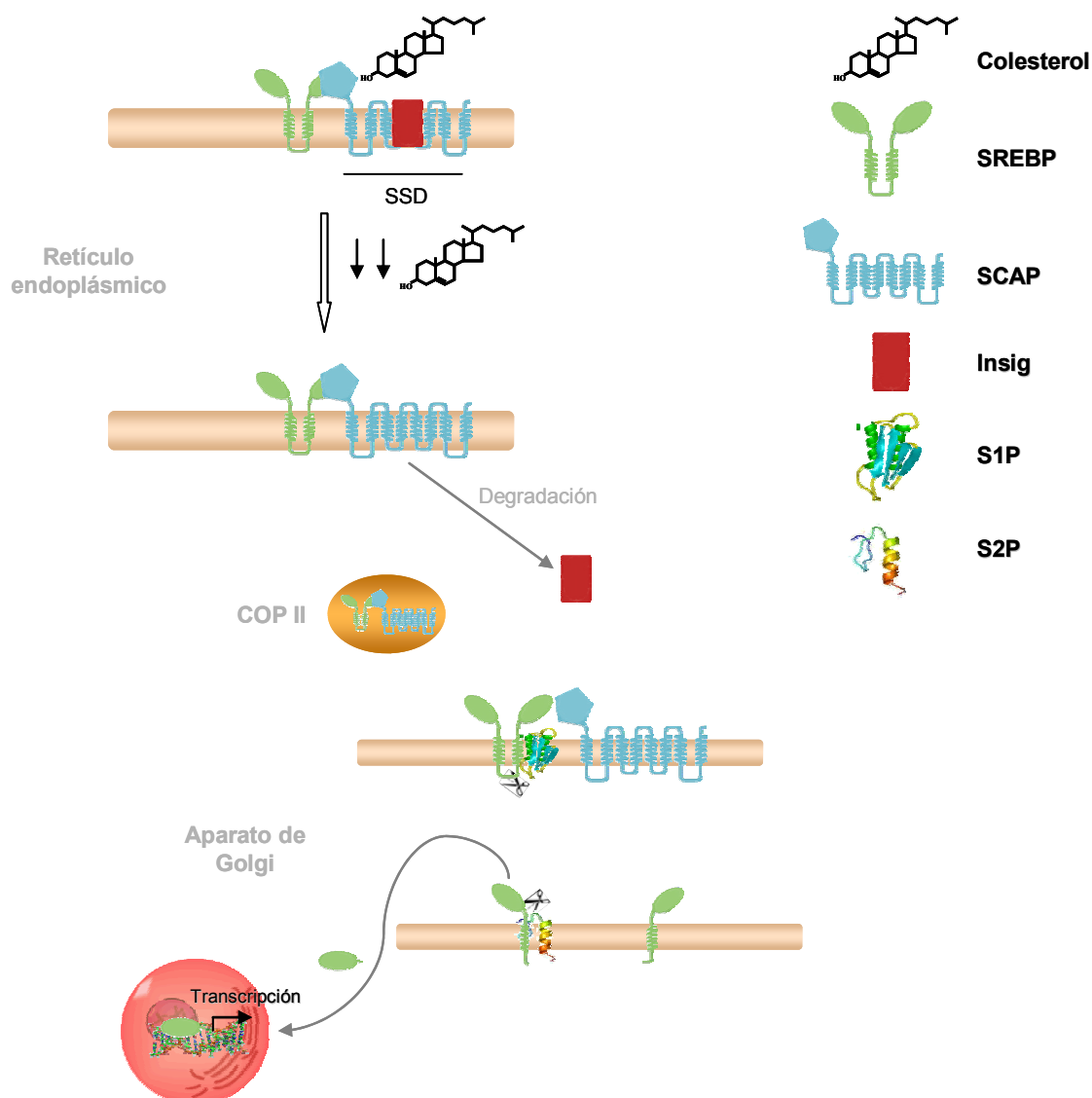
La transcripción de las enzimas de la biosíntesis de colesterol y del receptor de LDL así como de otras muchas proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico está regulada por los factores de transcripción SREBP (“sterol response element binding protein”) [31-33], que interactúan con los elementos SRE (“Sterol regulatory element”) localizados en la región promotora de los genes que codifican para aquellas proteínas, potenciando su transcripción.

Se conocen tres miembros de la familia de SREBP: SREBP-1a, -1c, que derivan del mismo gen por transcripción desde distintos sitios de iniciación, y SREBP-2. SREBP-1c, al que también se denomina ADD1, es el factor que predomina en la mayoría de los tejidos animales incluido el hígado [34] y su expresión está estimulada por la insulina [35, 36].

Cada uno de los miembros de esta familia juega un papel en la regulación del metabolismo lipídico. SREBP-1c estimula la transcripción de los genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos y la esterificación de los mismos [37], mientras que SREBP-2 gobierna la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de colesterol y el receptor de LDL [38]; SREBP-1a parece activar ambas vías [39, 40].

Los SREBP requieren sufrir una hidrólisis parcial para ser activos [34] [41]. Las formas precursoras de los SREBP se encuentran en el retículo endoplásmico (RE) formando un complejo con la proteína SCAP (SREBP-cleavage activating protein) [42] que consta de dos dominios: uno hidrofílico implicado en procesos de interacción entre proteínas y otro hidrofóbico en el extremo N-terminal. Este último consta de ocho segmentos transmembrana y se denomina “dominio sensible a esteroides” (SSD) ya que mutaciones en el mismo determinan una pérdida de la regulación por esteroides. Este dominio aparece también en otras proteínas implicadas en el metabolismo, transporte y señalización del colesterol, como la HMG-CoA reductasa o la proteína Niemann-Pick tipo C1 (NPC1) que participa en el trasiego de colesterol entre los lisosomas y diferentes estructuras subcelulares. En ausencia de colesterol, SCAP expone una secuencia de 6 aminoácidos (MELADL) que específicamente es reconocida por la proteína Sec24, que determina su incorporación a las vesículas COPII y, consecuentemente, su traslado al Golgi. Ahí se encuentran las proteasas encargadas del procesamiento de SREBP [43]. La primera de ellas es S1P (proteasa del sitio 1) que reconoce la secuencia RSVLS entre los segmentos transmembrana del SREBP y la hidroliza entre una Leu y una Ser. A continuación actúa la proteasa S2P (proteasa del sitio 2) que libera el fragmento N-terminal del SREBP al citosol. Este fragmento será el que finalmente alcance el núcleo donde interactuará con los elementos SRE para estimular la transcripción de los genes diana. Finalmente SREBP es degradada por el proteasoma [44] (**Esquema 6**).

La regulación de la activación de los SREBP se da a nivel del RE. El incremento de la concentración de colesterol en las membranas del RE produce un cambio de conformación de SCAP que oculta el dominio MELADL [45], lo cual impide que el complejo SCAP-SREBP sea transportado al Golgi.



Esquema 6. Regulación de la vía de SREBP por colesterol. Mientras hay esteroides en el medio, SREBP forma un complejo con SCAP que se mantiene retenido en el retículo endoplásmico por interacción con Insig en el dominio SSD. Cuando la presencia de esteroides disminuye Insig se degrada provocando un cambio conformacional en SCAP que, unido a SREBP, se desplaza al Golgi en las vesículas COP II. Una vez allí la proteína S1P hidroliza el segmento transmembrana de SREBP y S2P libera el fragmento N-terminal al citosol. Este fragmento alcanza el núcleo donde actúa como factor de transcripción de las enzimas implicadas en la biosíntesis de lípidos.

Esta retención en el RE está mediada por las proteínas Insig (“insulin-induced gene”)-1 e Insig-2 [46]. Estas proteínas tienen la capacidad de unirse al dominio SSD de Scap, que está modulada por el colesterol [47, 48]. La afinidad de Insig-1 por Scap es muy alta mientras que la de Insig-2 es menor y muestra una estricta dependencia sobre la presencia de esteroides. En cuanto a su expresión, INSIG-1 es ubicua y está activada por SREBP-1c y éste a su vez por insulina y LXR [49, 50]. *INSIG2* puede dar lugar a dos isoformas: INSIG-2a, cuya expresión es exclusivamente hepática y está inhibida por la insulina, e INSIG-2b, de expresión

ubicua y constitutiva [48, 51]. Estas diferencias determinan que en el hígado, en estado de alimentación, la expresión de INSIG-1 sea elevada y baja la de INSIG-2, todo ello inducido por la insulina; mientras que en ayunas ocurre lo contrario [52, 53]. La degradación de INSIG-1 es más rápida que la de INSIG-2 y se produce cuando disminuye la concentración de colesterol en el RE, que deja libre a INSIG-1 permitiendo su ubiquitinización y degradación por el proteasoma [54]. Esto permite el control del procesamiento de SREBP en un amplio rango de concentración de esteroides. Señalemos por último que mientras SCAP reconoce colesterol y otros esteroides, INSIG tiene un sitio de reconocimiento para oxisteroides y, en su presencia, se promueve la unión de INSIG a SCAP. De hecho, los oxisteroides son potentes inhibidores de la activación de SREBP. Resumiendo, según la cantidad total de INSIG y la expresión relativa de las distintas formas así será la respuesta a las variaciones en la concentración de esteroides en el RE. Toda esta complejidad confiere una enorme plasticidad al sistema, conducente a mantener la homeostasis intracelular del colesterol en las distintas situaciones fisiológicas posibles.

El bloqueo completo del procesamiento de SREBP se considera una situación fatal para la célula por cuanto no sólo conduciría a la inhibición total de la síntesis de colesterol, cuya transcendencia sería relativa ya que podría obtenerse de las lipoproteínas, sino también de los intermediarios isoprenoides indispensables para la supervivencia celular. Esta situación sólo se produce en condiciones excepcionales de sobreexpresión de Insig-1 [55]. En condiciones normales, precisamente el requerimiento de Insig-1, con sus especiales características, para que se produzca la inactivación de SREBP se ha interpretado como un mecanismo de seguridad para evitar que la célula no pueda sintetizar aquellos compuestos, pues mientras se transcribe Insig-1 (dependiente de SREBP activado) se transcriben los genes necesarios para la biosíntesis de esos intermediarios [53].

Aunque la regulación del metabolismo del colesterol (y del metabolismo lipídico en general) está protagonizada por los SREBP, otros factores también participan de forma decisiva. Entre ellos cabe mencionar los receptores nucleares LXR y PPAR así como los microARN (miARN), todos los cuales permiten integrar y coordinar el metabolismo lipídico con otros procesos fisiológicos.

Los PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) son una familia de receptores nucleares (PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ) que unen ligandos, forman heterodímeros con otro receptor nuclear y de esta manera regulan la expresión de ciertos genes cuyos productos están implicados en el metabolismo lipídico [56]. Tal es el caso de la lipoproteinlipasa que al ser estimulada por PPAR α produce una reducción general de las LDL.

Los receptores LXR (*liver X receptor*) actúan como sensores de colesterol produciendo el efecto contrario al que producen los SREBPs: disminuyen los niveles de colesterol en la célula mediante la activación de genes para el transporte reverso de colesterol e incrementan la conversión de colesterol en ácidos biliares [57]. Su activación se da fundamentalmente por oxisteroles formados durante la biosíntesis de colesterol y activan genes de transcripción implicados en la salida de colesterol de la célula como son ABCA1 (“ATP-binding casete transporter A1”), y ABCG1 (“ATP-binding casete transporter G1”) [58].

En cuanto a los miARNs son dobles cadenas de ARN endógenas, de unos 22 nucleótidos que se han identificado como reguladores post-transcripcionales de procesos fisiológicos [59]. Estos miARNs llevan a cabo su función uniéndose por complementariedad de bases a la región 3'UTR de los mRNA produciendo la inestabilidad del mismo e inhibiendo su traducción. Un solo miARN puede tener múltiples dianas lo que supone que puede regular simultáneamente diferentes genes implicados en una misma ruta fisiológica. Se han descrito dos miARN con relevancia en el metabolismo de lípidos [60]. El primero de ellos es miR-122 que produce un incremento de la expresión de genes implicados en la síntesis del colesterol en el hígado y el segundo es miR-33, identificado como regulador postranscripcional de la homeostasis del colesterol [60].

1.1.2.2. Regulación específica de la HMG-CoA reductasa

La HMG-CoA reductasa constituye la enzima limitante de la síntesis de colesterol y, como tal, es un foco primario de regulación. La complejidad del proceso fue revelada por primera vez a finales de los 70 mediante el empleo de compactina, un inhibidor competitivo de la reductasa que pertenece a la familia de las estatinas. El tratamiento de células en cultivo con compactina, bloqueaba la

síntesis de mevalonato reduciendo de este modo los niveles de isoprenos esteroides y no esteroides que, de forma general, gobiernan la retroregulación de la reductasa. Las células respondían a esa inhibición produciendo un drástico incremento de la proteína debido a cambios que se producían a tres niveles: el aumento de la transcripción del gen de la reductasa, una mayor eficiencia de traducción del ARNm y a un incremento de la vida media de la proteína. La adición de altas concentraciones de mevalonato o bajas concentraciones del mismo, pero combinado con LDL, revertía el efecto [61].

El elemento SRE presente en el promotor de la HMG-CoA reductasa no está implicado en el aumento de la transcripción en ausencia de esteroides, sino más bien en la regulación por la presencia de los mismos y de otros derivados no esteroides [14]. Esto supone que en el promotor de la enzima existen otras secuencias de reconocimiento, además del SRE, para otros factores de transcripción. Concretamente existen dos secuencias que se solapan con el sitio SRE: en el extremo 5' se localiza una secuencia de unión para la proteína Red25, un factor de transcripción que parece ser esencial para la regulación por esteroides, aunque no es el único [62]. En el extremo 3' otra secuencia de unión para el factor de transcripción NF-Y que, como el Sp1, es un factor coregulador y que también se encuentra adyacente a los SRE presentes en los promotores de otras enzimas de la colesterologénesis, como son la farnesil difosfato sintasa, la mevalonato quinasa, la escualeno sintasa y la HMG-CoA sintasa [14]. Todo ello indica que la regulación de la transcripción de la HMG-CoA reductasa no se puede explicar por un simple mecanismo positivo o negativo, sino por un complicado dispositivo en el que participan varios factores de transcripción.

La regulación de la HMG-CoA reductasa también se da postranscripcionalmente y a distintos niveles. Por un lado, los transcritos de ARNm y su estabilidad varían en las distintas situaciones. Así, cuando las células se exponen a estatinas, se incrementan los transcritos de clase I, que se asocian preferentemente a los polisomas pesados y se traducen activamente. Por el contrario, en presencia de 25-hidroxicolesterol, la estabilidad del ARNm es menor y se forman transcritos de clase II que se traducen deficientemente [63, 64]. También el mevalonato y alguno de sus derivados reducen la traducción del ARNm, tanto a nivel de iniciación como de elongación de la proteína [65, 66]. Este

tipo de control traduccional se ha propuesto como uno de los mecanismos principales de control *in vivo* de la HMG-CoA reductasa hepática por el colesterol de la dieta [67].

Otro de los mecanismos de la regulación de la HMG-CoA reductasa son los eventos de fosforilación-desfosforilación. Concretamente se conoce que la fosforilación de la Ser871 conduce a la inactivación de la enzima. Esta reacción está catalizada por la quinasa estimulada por AMP (AMPK), la cual responde a variaciones en el cociente ATP/AMP [68]. Así pues, la deficiencia energética detectada por la AMPK produce un descenso en la biosíntesis de colesterol [69]

La degradación de la proteína parece ser el mecanismo más importante de regulación de su actividad enzimática. La HMG-CoA reductasa es una proteína relativamente estable, con una vida media superior a 12 horas pero que se degrada rápidamente en presencia de esteroides. En este proceso participan decisivamente las proteínas INSIG. Se ha demostrado que los esteroides (especialmente el lanosterol) estimulan la interacción de la HMG-CoA reductasa con INSIG-1, lo cual conduce a la degradación de la enzima por el proteasoma. Efectivamente, se conoce que Insig-1 se asocia con la E3 ubiquitina ligasa gp78 y ésta, a su vez, con la E2 ubiquitina conjugasa Ubc7, lo cual permite que la HMG-CoA reductasa sea convenientemente ubiquitinizada [70]. Posteriormente, la enzima es extraída del RE por acción de la ATPasa VCR y se dirige al proteasoma para su degradación [71]. Este proceso de extracción es dependiente de geranylgeraniol (otro derivado del mevalonato). Así pues, la degradación de la enzima sólo se producirá en caso de suficiencia de esteroides y de isoprenoides. Por otra parte, el hecho de que INSIG-1 tenga mayor afinidad por lanosterol (y dihidrolanosterol) que por colesterol, determina que se monitorice selectivamente la actividad de la biosíntesis de colesterol y no sólo el contenido de colesterol, que puede obtenerse también por captación de las lipoproteínas. Esto ocurre porque los esteroides estimulan la interacción de la HMG-CoA reductasa con las proteínas Insig a través de su extenso dominio transmembrana la cual conduce a su ubiquitinación [70] y su degradación por el proteasoma [71]. También se conoce que la degradación de HMG-CoA reductasa se potencia por el mevalonato y algunos de sus derivados como el farnesol o el geranylgeraniol [5, 72] que permite la salida de la proteína

ubiquitinada del RE sugiriéndose la participación de alguna proteína prenilada en el proceso [70].

1.2 CONTROL DEL CICLO CELULAR

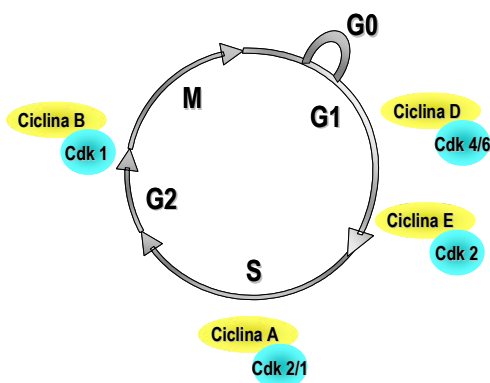
El ciclo celular es el proceso universal por el cual las células se dividen y participan en el crecimiento y desarrollo de un organismo. Cada estado de la vida de un organismo requiere un patrón de proliferación diferente. En mamíferos, durante el desarrollo embrionario temprano donde hay una alta tasa de división, pocas son las células que abandonan el estado proliferativo mientras que en organismos adultos la mayoría de las células no se dividen. Las células cancerígenas, por su parte, se caracterizan por un estado de proliferación incontrolado. Esta característica confiere a las células tumorales una ventaja selectiva ya que les permite evitar la entrada en un estado no proliferativo en el que se encontrarían si fueran células “normales”. Por este motivo el conjunto de procesos que ocurren durante el ciclo celular llevan un orden y una supervisión estrictos.

En eucariotas, el ciclo celular se ha dividido clásicamente en cinco fases. Cuando una célula quiescente (en fase G0) recibe los estímulos adecuados para proliferar entra en fase G1, donde aumenta su tamaño y se prepara para duplicar el material genético en la siguiente fase, la fase S o fase de síntesis de ADN. Una vez completada correctamente la replicación de ADN la célula llega a la fase G2 y, tras alcanzar el tamaño adecuado se divide por mitosis.

Todo este proceso está finamente regulado por una familia de serina-treonina quinasas que se activan en determinados puntos del ciclo celular por unión a otras proteínas llamadas ciclinas y reciben por ello el nombre de quinasas dependientes de ciclinas (Cdks). Las ciclinas deben su nombre a que se sintetizan y degradan cíclicamente y van a constituir la subunidad reguladora del complejo Cdk-ciclina mientras que las Cdk formarán la unidad catalítica. En mamíferos se conocen 29 proteínas designadas como ciclinas ya que tienen un dominio común denominado caja de ciclina (“cyclin box”) y unas 20 proteínas en la familia de las Cdks. Sin embargo, sólo 11 de estas ciclinas (ciclinas A1, A2, B1, B2, B3, D1, D2, D3, C, E1 y E2) y 5 de las Cdk (Cdk1, Cdk2, Cdk3, Cdk4 y Cdk6) se asocian al control del

ciclo celular [73, 74]. Las ciclinas se unen a su Cdk correspondiente en el momento del ciclo en que es necesario que estas últimas fosforilen a sus sustratos, los cuales, a su vez, serán necesarios para la síntesis y/o activación de los factores implicados en los subsecuentes procesos del ciclo celular (**Esquema 7**). Uno de los sustratos más importantes de Cdk son las proteínas de la familia de la proteína del retinoblastoma (pRb), las cuales actúan como represores de la expresión génica, fundamentalmente en G1, mediante su unión a los factores de transcripción E2F.

Por otro lado, existen proteínas que inhiben las Cdk (proteínas CKI). Estas proteínas ejercen su función cuando el papel de la Cdk en el ciclo ya se ha realizado o cuando las condiciones no son adecuadas para proliferar. Se conocen dos familias de CKI: la familia Cip/Kip, que incluye a las proteínas p21, p27 y p57, las cuales forman complejos ternarios e inhiben a todas las parejas Cdk-ciclina, y la familia de los INK4, cuyos miembros, p14, p15, p16, p18 y p19, son inhibidores específicos de Cdk4 y Cdk6 y, por tanto, específicos de G1 [75-77].



Esquema 7. Representación de la regulación del ciclo celular por los complejos ciclina/Cdk.

1.2.1. Control de la fase S

Hay toda una serie de agentes externos e internos que producen diferentes tipos de estrés replicativo y daño genotóxico. En respuesta a este tipo de daño las células proliferantes detienen el ciclo celular en diferentes puntos para asegurar la reparación del mismo. En células eucariotas estos puntos de control ("checkpoints") consisten en sofisticados mecanismos de supervivencia que activamente retrasan un evento posterior del ciclo celular hasta que un evento previo se ha completado correctamente. Si esto no ocurre, el ciclo se para a la

espera de que las condiciones sean adecuadas o se induce la apoptosis si la situación no se solventa. Estos puntos de control se localizan justo antes de comenzar los procesos fundamentales de la división celular como son la salida de la fase de quiescencia, la replicación del ADN y la mitosis (puntos de control de G1, S y G2/M respectivamente) [78-82].

Los puntos de control no son exclusivos del daño en el ADN. Por ejemplo, ante una deficiencia de colesterol mantenida, las células sufren un bloqueo del ciclo celular en la fase G2/M al no disponer de colesterol suficiente para poder completar la citocinesis [83, 84].

Cuando se produce un daño en el ADN las células, de forma general, bloquean el ciclo celular en la fase G1 gracias a la participación de la proteína p53. Esta proteína se encuentra mutada en la mayor parte de las células tumorales, por lo que estas células se apoyarán en los puntos de control de S y G2 para evitar la inestabilidad genómica, el incremento en la tasa de mutaciones y el desarrollo del cáncer al que darían lugar estos eventos [85, 86].

Inicialmente se propuso que estos puntos de control constituirían la unión entre la reparación del ADN y el progreso a través del ciclo celular. En último término su función consistiría en retrasar la mitosis dejando tiempo a los mecanismos de reparación para actuar. Sin embargo, resultados posteriores demostraron que, en realidad, la activación de este punto de control suponía la señalización de la maquinaria de reparación y/o recombinación del ADN lo que implicaba un retraso del progreso del ciclo celular al reducirse la activación de los orígenes de replicación y la tasa de elongación de las horquillas de replicación [87].

El punto de control de daño al ADN de la fase S está formado por redes de proteínas que pueden clasificarse en sensoras, transductoras y efectoras del daño en el ADN. En mamíferos, en el centro de estas complejas redes se encuentran dos proteínas sensoras: ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) y ATR (*ATM y Rad-3 related*) que son las encargadas de detectar bloqueos en las horquillas de replicación, ADN dañado o intermediarios de reparación del ADN [88]. Ambas proteínas presentan subunidades reguladoras que serán las encargadas de transmitir la señal a las proteínas efectoras principales, Chk1 y Chk2 ("*checkpoint1*" y "*checkpoint2*" respectivamente), y otros sustratos encargados de la estabilización de las horquillas de replicación y la ralentización del ciclo celular [87, 89, 90].

La activación de ATM y/o ATR depende del tipo de lesión que genera el daño [91]. En mamíferos la vía de ATM se activa preferentemente en respuesta a dobles roturas en el ADN (DSB, “*double strand breaks*”) producidos por radiación ionizante (IR), mientras que la vía de ATR lo hace en respuesta a diversas lesiones del ADN generadas por radiación UV o bloqueos en las horquillas de replicación. No obstante existe un entrecruzamiento entre ambas vías [88]

En cuanto a las proteínas efectoras, Chk1 y Chk2, no parecen tener papeles excluyentes y ambas pueden tener una función en las vías de respuesta al daño en el ADN y el estrés replicativo. Aunque en un principio se estableció que la activación de Chk1 dependía únicamente de ATR y la de Chk2 de ATM, estudios posteriores indicaron que existía un importante cruce entre ambas vías. Así, Chk1 puede ser fosforilada en respuesta a IR de forma dependiente de ATM y Chk2 puede activarse independientemente de ATM [92, 93]. No obstante, se admite que Chk2 se activa fundamentalmente por ATM en respuesta a DSB causados por IR. La activación de Chk2 contribuye a la estabilización de p53 que promueve tanto el bloqueo del ciclo celular como la apoptosis [94].

Al margen de sus funciones paralelas en la señalización de los puntos de control, Chk1 y Chk2 son proteínas con diferente importancia biológica. Así, mientras que los ratones deficientes para Chk2 son viables, no muestran defectos en el desarrollo y no desarrollan tumores espontáneamente, los ratones deficientes para Chk1 presentan embriones letales y sus células embrionarias no son viables [92, 95].

1.2.1.1. Papel de las proteínas ATR y Chk1

La señal más común para la activación de ATR es probablemente el estrés replicativo. Este tipo de estrés puede ser generado por la interferencia de la progresión de la horquilla de replicación causada por daño en el ADN, la deficiencia de desoxinucleótidos o incluso de dificultad de replicar determinadas secuencias de ADN [96]. Ante este tipo de estrés, ATR regula la estabilidad del replisoma y la activación de orígenes de replicación previniendo la entrada prematura en mitosis [88].

Existen múltiples proteínas que interaccionan con ATR, pero de todas ellas probablemente la única que sea obligatoria para su función sea ATRIP (ATR-interacting protein). De hecho, cuando se silencia el gen de ATRIP en células de mamífero se produce una pérdida de función de ATR que se traduce en una alta sensibilidad al daño en ADN, ausencia de fosforilación de los sustratos de ATR y letalidad [97].

De la larga lista de sustratos de ATR, Chk1 es la mejor estudiada. Esta proteína se identificó por primera vez en levaduras como componente esencial del punto de control de daño en el ADN, aunque más tarde se demostró que también tenía un importante papel en el punto de control de la replicación de ADN en ausencia de estrés [98, 99].

La activación de Chk1 requiere la fosforilación, por parte de ATR, de dos de sus residuos: S317 y S345 [95, 100]. Al contrario que otras proteínas de punto de control que actúan en los lugares del daño en el ADN, Chk1 extiende la señalización del daño a todo el núcleo. Para que se de esta activación es fundamental la participación de una proteína que se ha descrito como “mediadora” en la horquilla de replicación, la claspina, cuya función es la de unir a ATR y Chk1 [101].

En células proliferantes normales, Chk1 se encuentra asociada a la cromatina. Cuando se produce un daño en el ADN, Chk1 se fosforila en el residuo S317 y se separa de la cromatina [102] promoviéndose entonces la fosforilación en el residuo S345 lo que provoca su migración al citoplasma (**Esquema 8**). Una vez allí debe estar fosforilada en ambos residuos para asociarse al centrosoma. Es en esa localización desde donde ejerce su función fosforilando a otros sustratos, entre los cuales son fundamentales para el control del ciclo celular las proteínas de la familia Cdc25 [103].

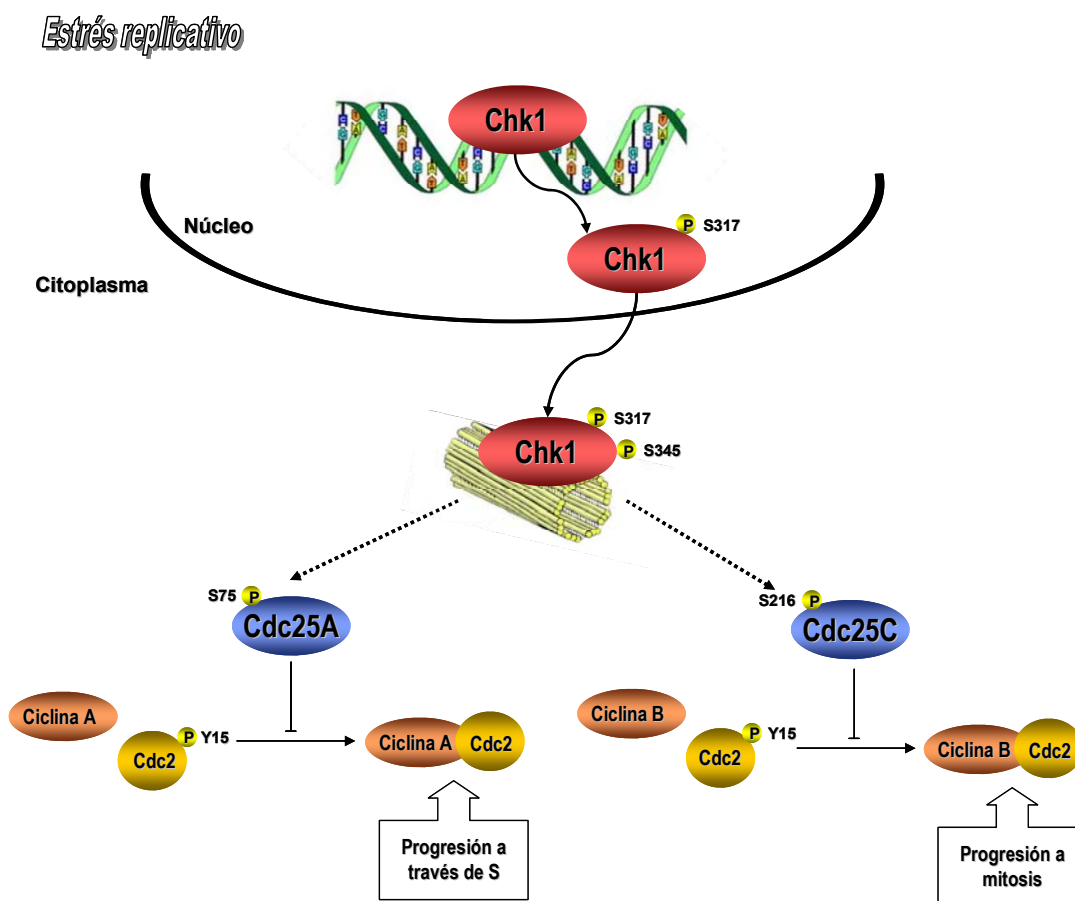
En humanos existen tres proteínas Cdc25 (A, B y C) que regulan la progresión a través de las distintas fases del ciclo celular mediante la eliminación de las fosforilaciones inhibitorias de las proteínas Cdk's [104]. Así, la regulación de la fosforilación de Cdc25 por parte de Chk1 inhibe su actividad impidiendo la activación de las Cdk's. Este es el mayor mecanismo de punto de control que previene la progresión a través de S y la entrada en mitosis cuando se produce un daño en el ADN [105]. Concretamente, el punto de control de S se basa en una regulación de la degradación de Cdc25A por parte de Chk1 [106].

Pero Chk1 también tiene un papel importante en la progresión del ciclo celular de células normales no sometidas a ningún estrés genotóxico ni daño en el ADN. Previamente se había demostrado que el papel que en levaduras desempeñan los homólogos de Chk2, Rad53 y Cds1, en el mantenimiento de la integridad y la inhibición de nuevos orígenes de replicación, en vertebrados estaba regulado por Chk1[107]. Estos autores demostraron que la inhibición de Chk1 con UCN01 en células no sometidas a ningún tipo de estrés genotóxico ni agentes que provocan daño en el ADN, conduce rápidamente a la activación de ATR para proteger a la célula de la hiperactivación de Cdc2 y estabilizar a Cdc25A, dando como resultado un incremento del factor de replicación Cdc45 acompañado de la activación de orígenes de replicación y una desestabilización del genoma que queda evidenciada por la presencia de DSB. Esto explicaría que las células embrionarias Chk1^{-/-} sean letales [95] ya que la falta de Chk1 supone la ausencia de control del inicio de la replicación que generaría roturas en las cadenas de ADN, lo que activaría la respuesta apoptótica por parte de la célula.

Como se ha mencionado más arriba, de forma general ATM se asocia con daño en el ADN de tipo DSB y ATR con agentes que provocan un bloqueo de la replicación [108-110]. Se ha observado, sin embargo, que ATR y Chk1 también se activan en respuesta a DSB con la función de mantener la fosforilación específica de diferentes sustratos [111].

1.2.1.2. Papel de la proteína γ -H2AX

Otra de las proteínas claves en el mantenimiento de la estabilidad genómica implicada en el punto de control de la fase S es la histona H2AX. En células de mamífero, la fosforilación de la proteína H2AX en la Ser139 se produce como respuesta a la formación de DSB. Esta forma fosforilada de H2AX se conoce como γ -H2AX [112]. Las roturas de doble cadena son el tipo de daño al ADN más peligroso para las células ya que, según parece, un solo DSB es suficiente para desencadenar un proceso de muerte celular [113].



Esquema 8. Representación de la respuesta al estrés replicativo mediada por la proteína Chk1. La activación de Chk1 por fosforilación en el residuo S317 provoca su separación de la cromatina y una vez libre en el núcleo la fosforilación en S345 promueve su liberación al citoplasma donde se une al centrosoma. Desde esta localización centrosomal Chk1 promueve la fosforilación de diferentes Cdc25 fosfatasas en los sitios inhibitorios lo que provoca que no se puedan desfosforilar los residuos tirosina de Cdc2 y no se formen los complejos ciclina-Cdk necesarios para progresar a través de las diferentes fase del ciclo celular.

Existen toda una serie de factores físicos, químicos y biológicos capaces de generar DSB. Sin ir más lejos, las células vivas existen en un medio en el que de forma natural se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) como resultado de los diferentes procesos metabólicos. Esta generación de ROS da lugar a daño en el ADN de tipo DSB, de hecho se estima que en un solo ciclo celular tienen lugar al menos 5000 roturas del ADN, de las cuales un 1% se transformarán en DSB y el 99% restante serán reparados. La acumulación de ADN no reparado inducido por ROS produce envejecimiento celular y podría ser la responsable de la inducción de transformaciones neoplásicas.

Como se ha comentado en el apartado anterior, las células han desarrollado mecanismos altamente conservados para el reconocimiento del daño en el ADN y

la activación de puntos de control encaminados a subsanar dicho daño. El papel de γ -H2AX consiste en atraer los factores de reparación hacia el lugar donde se ha producido el daño, como lo demuestra la colocalización que se produce entre las proteínas reparadoras (como el complejo MRE11-RAD50-NBS1, o las proteínas BRCA1, 53BP1, MDC1) y γ -H2AX en los focos nucleares [114].

La activación de H2AX se da mayoritariamente por ATM, aunque diversos estudios han demostrado que también es sustrato de ATR. En el caso de ATM, que se encuentra formando dímeros inactivos en condiciones normales, la remodelación cromosómica que sigue a la formación de un DSB promueve la fosforilación de ATM en la serina 1981 y con ella la generación de dos moléculas de proteína independientes con actividad quinasa incrementada [115]. Así, esta ATM activa es reclutada a los lugares de los DSB por el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) y allí fosforila a sus diferentes sustratos como lo son γ -H2AX, encargada de reclutar los factores de reparación, y p53 o Chk2 responsables de activar el punto de control que bloquea el ciclo celular hasta que se produce la reparación del ADN (**Esquema 9.A**).

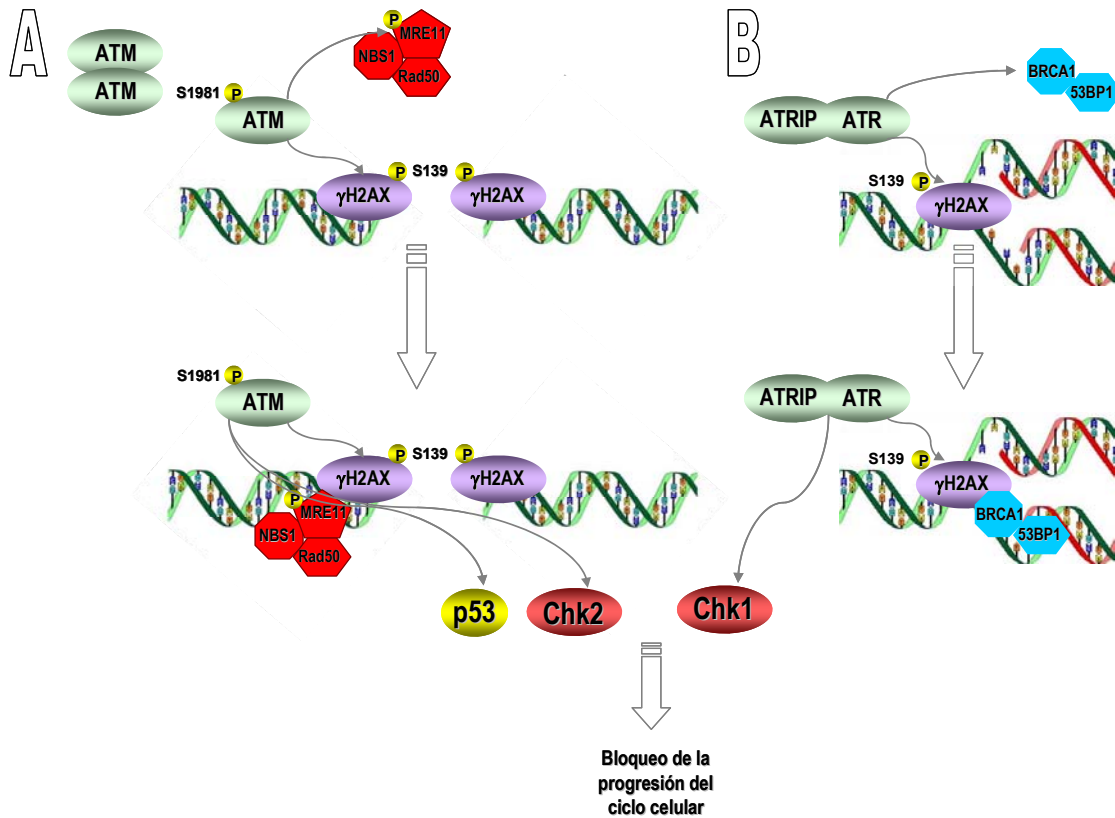
ATR también tiene la capacidad de activar H2AX cuando se produce un estrés replicativo como el bloqueo de las horquillas de replicación [116]. En este caso también parece que la remodelación cromosómica producida por el daño en el ADN sea el factor responsable de la activación de la vía de ATR y que la activación de γ -H2AX tenga como fin el reclutamiento de los factores de reparación (**Esquema 9.B**).

1.2.2. Papel de las MAPKs en el ciclo celular

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) constituyen una familia de serin-treonina quinasas cuya función consiste en transmitir, amplificar e integrar señales de toda una serie de estímulos, para elaborar la respuesta fisiológica apropiada. Estas respuestas son tan variadas como los estímulos que las provocan e incluyen diferenciación, apoptosis, desarrollo, respuestas inflamatorias y proliferación [117].

Existen tres principales vías de MAPK que forman cascadas de transducción de señales relacionadas entre sí: ERK (“extracellular signal-regulated kinase”), JNK (“c-Jun N-terminal kinase”) también conocida como SAPK (“stress-activated

kinase”) y p38 MAPK. Estas vías suelen ser activadas por distintos estímulos, aunque todas ellas parecen entrecruzarse y complementarse en ciertos puntos [118].



Esquema 9. Representación de la activación de γ H2AX por ATM (A) o ATR (B). La generación de roturas en el ADN de tipo DSB generadas por agentes externos o por bloqueos en las horquillas de replicación provocan la fosforilación de γ H2AX mediada por ATM o ATR. En ambos casos un cambio conformacional de la cromatina activa estas proteínas sensoras que fosforilan a γ H2AX provocando de este modo el reclutamiento de factores de reparación al lugar del daño. De este modo se activa una cascada de señalización mediada por Chk1 y Chk2 que serán las proteínas efectoras responsables de bloquear el ciclo celular hasta que se repare el daño.

La vía de ERK es uno de los mecanismos claves para la transmisión de señales de la superficie celular al núcleo. Las primeras isoformas identificadas de la proteína presentaban un peso molecular de 42 y 44 kDa y al ser clonadas recibieron el nombre de ERK1/2 [118]. De forma general esta vía se activa por factores de crecimiento. Una vez activadas, las ERK se trasladan al núcleo donde transactivan factores de transcripción y modifican la expresión de determinados genes que promueven el crecimiento, la diferenciación o la mitosis [117]. En relación a la proliferación y la progresión del ciclo celular esta vía está implicada en la progresión de G0/G1 a S [119]. Tras la activación de ERK se induce una

cascada de señales que en último término regulan la expresión de la ciclina D1. El incremento de la expresión de esta proteína incrementa a su vez la formación del complejo ciclina D-Cdk4/6 que fosforila e inhibe a pRb favoreciendo la activación de la familia de factores de transcripción E2F. Esta activación lleva a la expresión de genes de la segunda clase de ciclinas del ciclo celular, la ciclina E. La activación del complejo ciclina E/Cdk2 da lugar de nuevo a la inactivación de pRb, la activación de E2F y la síntesis de proteínas requeridas para la entrada en fase S [120]. El papel de esta vía en la proliferación celular requiere una activación sostenida de ERK. De este modo, además de la activación de genes proliferativos comentada, se mantiene inhibida la expresión de una serie de genes antiproliferativos como son p21 o p53. Ante una situación de estrés la activación de ERK cesa, los genes antiproliferativos se expresan y se inhibe la entrada en fase S [121].

La vía de JNK consiste en una cascada de reacciones de fosforilación que conducen a la activación de esta proteína. En células de mamífero se han descrito tres isoformas: JNK1, JNK2 y JNK3. Las dos primeras proteínas se expresan ubicuamente mientras que JNK 3 se restringe a cerebro, corazón y testículos [122]. Aunque no está claro el significado funcional de estas diferentes isoformas, se sabe que JNK1 juega un papel importante en la producción de neuritas en células PC12 [123], mientras que JNK2 está implicada en la regulación de la expresión de E-selectina y en la mitosis [124]. En referencia a este último papel de JNK se ha demostrado que JNK se localiza en los centrosomas y se mantiene activa desde la fase S temprana hasta la anafase, alcanzando su actividad máxima en metafase [125].

El sustrato mejor estudiado de JNK es la proteína c-Jun que lleva a cabo la regulación de genes relacionados con la proliferación celular y la apoptosis. Al contrario que ERK, la vía de JNK y la de p38 se activan tanto por factores de crecimiento como por diferentes tipos de estrés. En el caso de JNK su activación se induce por factores de crecimiento como el IGF-1 ("insulin-like growth factor-1") promoviendo el crecimiento celular [126]. Por otro lado, puede provocar la inhibición de la proliferación en respuesta a señales como las citoquinas inflamatorias, la radiación ionizante o agentes que interfieren con los microtúbulos como la colchicina [127, 128]. En algunos de estos casos se ha observado que la

inhibición de la proliferación se da por una disminución de la actividad del complejo ciclina B-Cdk1 y que esta disminución coincide con la activación de la ruta de JNK. Así, JNK inhibiría a Cdc25C por fosforilación del residuo S168 lo que impediría la formación del complejo ciclina-Cdk [129]. Esta regulación sería diferente de la ejercida por Chk1 ante un daño en el ADN, ya que fosforila a Cdc25C en S216. Algunos autores han propuesto que JNK mediaría la respuesta de ERK en el estímulo de la proliferación celular [130].

Por último p38 MAPK comprende una familia de cinco proteínas homólogas: p38 α , p38 β , p38 β 2, p38 γ y p38 δ [131]. De las tres vías de MAPK presentadas aquí, esta parece ser la que tiene un mayor papel en los procesos de apoptosis, diferenciación, supervivencia, proliferación, inflamación y otras respuestas al estrés celular. Así, la activación de esta vía conduce a la inhibición de la proliferación celular como se ha demostrado en repetidas ocasiones. Por ejemplo, la activación de p38 en G1 inhibe la expresión de la ciclina D1 impidiendo la transición a S [132, 133]. En la transición de G2 a M, la activación de p38 MAPK por daño en el ADN conduce a la degradación de Cdc25C, lo cual impide la transición a M por falta de activación del complejo ciclina B1/Cdk1 [134]. Por lo tanto, p38 MAPK actúa como una proteína reguladora que impide la proliferación celular en respuesta al daño celular [135] y, de hecho, la inhibición de la vía de p38 MAPK resulta en la estimulación de distintos genes relacionados con la proliferación celular y en un aumento del índice mitótico en diferentes líneas celulares [136-138]. p38 MAPK se considera actualmente un importante gen supresor de tumores, al igual que p53 [135, 139]. Recientemente se ha demostrado que p38 MAPK participa activamente en la regulación fisiológica de la transición a mitosis en ausencia de estrés [140].

1.3 EL COLESTEROL EN LA PROLIFERACIÓN Y EL CICLO CELULAR

El colesterol es un componente fundamental de las membranas celulares de mamíferos, donde contribuye a conferir las propiedades físicas de fluidez y permeabilidad pasiva precisas [141]. Este papel estructural junto con las funciones

reguladoras que ejerce [4, 142] determinan que el colesterol sea esencial para la proliferación celular [143, 144].

En nuestro laboratorio hemos estudiado el papel del colesterol en la progresión del ciclo celular. Mediante el empleo de inhibidores distales de la biosíntesis de colesterol se pudo demostrar que la carencia de colesterol conduce a una parada del ciclo celular en la fase G2/M en células HL-60 y MOLT-4 [4, 142, 145-148]. Este efecto es prevenido y revertido por el colesterol, demostrando su especificidad [4, 142, 145-148].

El estudio comparativo con otros esteroides permitió determinar que para sustentar la proliferación celular los esteroides deben poseer un grupo hidroxilo en el C3 con configuración beta, una saturación en el C5 y una configuración trans de los anillos A y B [146]. En cuanto a la cadena lateral, la insaturación en C24 no afecta, como lo demuestra el hecho del desmosterol es perfectamente capaz de permitir la proliferación de las células deficientes de colesterol [149].

A nivel molecular, el colesterol induce la expresión de ciclina B1 y la activación de Cdk1 [4, 142], lo cual permite la transición de G2 a mitosis. Por otra parte, el colesterol es necesario para que se proceda a la citocinesis [83, 84].

Existe una estrecha relación entre la tasa de síntesis de colesterol y la proliferación celular. De hecho las células quiescentes presentan una baja tasa de síntesis de colesterol mientras que se eleva considerablemente en las células proliferantes [150]. La tasa máxima de síntesis de colesterol se alcanza en la fase G1 donde se da la activación de la HMG-CoA reductasa [151, 152] que disminuirá posteriormente durante la fase S [153]. En mitosis se produce un nuevo repunte de la biosíntesis de colesterol [154]. Esto se ha atribuido a la fosforilación de SREBP-1a y 1c que se produce por efecto del complejo ciclina B-Cdk1, que estabiliza la forma nuclear de estas proteínas y se traduce en un aumento de su actividad transcripcional [154]. En esta fosforilación también podría estar implicada ERK que es capaz de fosforilar a SREBP-1a in vitro en respuesta a mitógenos [155].

El tratamiento de las células con estatinas, que inhiben la HMG-CoA reductasa, también impide la proliferación celular pero en este caso los mecanismos son más complejos porque se afecta tanto la biosíntesis de colesterol como la de los isoprenoides no esteroides [156-161]. En nuestro laboratorio se demostró que el tratamiento con dosis moderadas de estatinas, que generan una

deficiencia de colesterol únicamente, produce una parada del ciclo celular en la fase G2/M, la cual se previene suministrando colesterol [145]. Si se incrementa la dosis de estatinas hasta bloquear por completo la síntesis de mevalonato, las células sufren un bloqueo en G1 que puede prevenirse añadiendo colesterol y mevalonato al medio [145]. Estos resultados indican que el mevalonato o alguno de sus derivados isoprenoides no esteroides se requieren para la entrada en la fase S, mientras que el colesterol es necesario para el avance desde G2 [145].

A pesar de la demostrada necesidad de mevalonato para una correcta progresión del ciclo celular, Cuthbert y Lipsky observaron, mediante la inhibición de la MVD con fluoromevalonato, que la acumulación de mevalonato o alguno de sus derivados tenía una influencia negativa en la proliferación celular [162]. En primer lugar comprobaron que el Fmev produce una inhibición de la proliferación de toda una variedad de células linfoides y mieloides medida por incorporación de [H^3]-timidina al ADN. En base a estas observaciones propusieron que la inhibición podría ser provocada por dos mecanismos diferentes: la inhibición de la síntesis endógena de colesterol y/o la acumulación de un derivado de mevalonato con carácter inhibitorio. La primera de las propuestas se sustentaba en que la adición de colesterol en forma de LDL prevenía el efecto del Fmev. La segunda, porque la adición de lovastatina (o cualquier otro inhibidor de la HMG-CoA reductasa) también previene la inhibición de la proliferación observada [162]. Esta última observación supone que la concentración celular de mevalonato y/o de algún derivado inmediato suyo es crítica en la regulación de la proliferación. En cuanto al requerimiento de colesterol comprobaron que la adición de LDL a bajas concentraciones, que sin embargo eran suficientes para prevenir el efecto de lovastatina, no evitaba la inhibición de la síntesis de ADN; el efecto del Fmev sólo se prevenía con dosis de LDL altas, que también inhiben la actividad de la HMG-CoA reductasa y, por tanto, la síntesis de mevalonato. Es decir, que el efecto de altas dosis de LDL estaría emulando el de la lovastatina. Estos resultados indican que el mevalonato es un determinante crítico de la proliferación celular ya que es una fuente tanto de influencias positivas como negativas. La observación de que la inhibición de la proliferación mediada por Fmev solo se da cuando las células se cultivan en ausencia de colesterol (si este es añadido al medio de cultivo el Fmev no tiene efecto) llevó a concluir que, en células normales, el colesterol no sólo

proporciona los esteroides necesarios para una correcta proliferación sino que además evita la acumulación de derivados de mevalonato con carácter inhibitorio [156].

1.4 LA PROTEÍNA AMPK. IMPLICACIONES EN EL METABOLISMO DEL COLESTEROL Y EL CICLO CELULAR

Hasta aquí ha quedado demostrado que existe una estrecha relación entre los procesos metabólicos que se dan en la célula (como el metabolismo del colesterol) y la progresión del ciclo celular. Así, alteraciones en estos procesos metabólicos llevan a la activación de distintos puntos de control del ciclo celular pudiendo llevar incluso a la muerte de la célula cuando las condiciones no son las adecuadas para que se complete el ciclo.

Una proteína clave en la regulación de estos procesos metabólicos es la proteína AMPK ("AMP activated protein kinase"). Esta enzima actúa como sensora de los niveles de AMP participando así en el mantenimiento de un correcto balance entre la energía consumida y la producida [68].

1.4.1. Estructura de AMPK

A nivel estructural se trata de una proteína heterotrimérica compuesta por tres subunidades: α , β y γ [163]. La subunidad α es la catalítica y contiene el residuo Thr172 cuya fosforilación es requerida para la completa actividad de la enzima [164]. La subunidad γ contiene cuatro repeticiones en tandem que constituyen el lugar de interacción con 2 AMP ó ATP y un tercer AMP no intercambiable [165]. Mientras que la unión de ATP mantiene una baja actividad de la enzima, el intercambio de ATP por AMP es suficiente para promover la activación de la enzima por un mecanismo alostérico (es decir, el inhibidor o activador es estructuralmente diferente de los sustratos y se fija en su propio sitio lejos del centro activo) [164]. Además, la unión de AMP incrementa la fosforilación de Thr172 lo que, en combinación con el efecto alostérico supone una activación de la enzima de hasta 1000 veces [166].

1.4.2. Acciones de AMPK sobre el metabolismo

La activación de AMPK generalmente va ligada a la estimulación de respuestas metabólicas destinadas a prevenir crisis energéticas y metabólicas en situaciones en las que la síntesis de ATP se ve comprometida (casos de hipoxia, isquemia, baja disponibilidad de nutrientes, etc.) o bien, cuando se acelera el consumo de ATP [163, 167, 168]. Uno de los principales papeles de AMPK orientado a la generación de energía es el de la activación de la oxidación de ácidos grasos. Para ello AMPK fosforila directamente la acetil-CoA carboxilasa (ACC), enzima que cataliza la reacción de formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA y que constituye el primer paso en la síntesis de lípidos [169]. A su vez, malonil-CoA actúa como inhibidor alostérico de la proteína CPT1 que es la responsable del consumo de ácidos grasos por la mitocondria por el mecanismo de β -oxidación. Así, la fosforilación de ACC por parte de AMPK produce un descenso de la tasa de síntesis de lípidos y una liberación de la proteína CPT1 lo que se traduce en un mayor transporte de los ácidos grasos a la mitocondria para la β -oxidación. El proceso de β -oxidación estimula la síntesis de ATP que permite responder a las demandas energéticas de la célula.

Otro de los procesos metabólicos afectados por AMPK es la colesterogénesis. Así, en condiciones de estrés metabólico AMPK fosforila e inhibe la HMG-CoA reductasa, reduciendo de este modo el consumo energético de la ruta de biosíntesis de colesterol [170]. Además, algunos autores han descrito que AMPK produce la represión de reguladores clave del metabolismo de lípidos como SREBP-1c [171, 172].

Por último, AMPK tiene un efecto inhibidor de la síntesis de proteínas tanto a través de la inhibición del factor de elongación eEF2 como de la vía de mTOR [173, 174].

Así pues, AMPK ejerce amplios efectos encaminados al ahorro energético, estimulando el empleo de lípidos como fuente de energía mitocondrial, y la formación de ATP a través de la glucólisis.

1.4.2.1. Regulación de la proliferación y el ciclo celular por AMPK

Tal y como se ha visto hasta aquí, el papel de AMPK ante una deficiencia de ATP o un estrés metabólico está encaminado a la inhibición de aquellos procesos que consumen energía. En lo que se refiere a proliferación celular, la regulación por AMPK se da de dos maneras: mediante el control de la vía de mTOR o mediante la regulación de los eventos de fosforilación/desfosforilación de proteínas del ciclo celular como p53 o pRb.

El complejo mTORC1 actúa como un regulador principal del crecimiento celular. Mientras que AMPK se activa bajo condiciones de baja disponibilidad de nutrientes y permanece inactiva cuando los nutrientes están disponibles, mTOR responde de forma inversa y requiere la confluencia de suficientes nutrientes y de la presencia de factores de crecimiento para ser activa. AMPK regula mTORC1 a través de dos mecanismos: por un lado fosforila raptor – una subunidad de mTORC1 – promoviendo su degradación e inactivando el complejo; por otro, AMPK fosforila TSC (“Tuberous Sclerosis Complex”) 1, la cual a su vez conduce a la inactivación de mTORC1. Por lo tanto, la deficiencia de ATP, detectada por AMPK, puede conducir a la inactivación de mTORC1 y la consecuente detención del crecimiento celular e inducción de la apoptosis [173].

En cuanto a la regulación directa de proteínas del ciclo celular, AMPK controla principalmente la regulación de la proteína p53 [175, 176]. En circunstancias normales, p53 es ubiquitinizada y degradada rápidamente. Una serie de modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación y la acetilación pueden estabilizar la proteína y promover la parada del ciclo celular. En línea con esto, la fosforilación de p53 por AMPK estabiliza p53 e induce la expresión de su diana p21 [175, 176], la cual promueve la parada en G1 y G2 [177]. Así, una baja disponibilidad de nutrientes y/o estrés energético podría traducirse en una inhibición natural de la división celular para asegurar el sustento de la célula.

Por otro lado diferentes estudios han demostrado que el tratamiento con un activador sintético de AMPK, el compuesto AICAR, induce un bloqueo del ciclo celular en fase S [178].

Por último se ha demostrado que AMPK regula otro factor fundamental en la progresión del ciclo celular, la proteína del retinoblastoma (pRb). Como ya se ha mencionado más arriba esta proteína ejerce su función mediante la modulación de

la actividad de miembros de la familia de factores de transcripción E2F. Pues bien, AMPK tiene la capacidad de fosforilar a pRb en S804 lo que provoca la disociación del complejo pRb/E2F activando la transcripción de diferentes genes implicados en la progresión del ciclo celular [179, 180].

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Estudiar los efectos de la inhibición experimental de la enzima mevalonato difosfato descarboxilasa sobre:
 - la tasa de síntesis de colesterol y la posible acumulación de compuestos intermediarios de la ruta de biosíntesis.
 - la proliferación, el ciclo celular y la síntesis de ADN.
2. Estudiar los mecanismos moleculares por los que la inhibición experimental de la enzima mevalonato difosfato descarboxilasa afecta la replicación del ADN y la proliferación celular.
3. Estudiar el papel del colesterol y del mevalonato sobre los efectos de la inhibición de la mevalonato difosfato descarboxilasa en la proliferación, el ciclo celular y la síntesis de ADN.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 REACTIVOS

El 6-fluoromevalonato, el fenilacetato, el farnesil difosfato (FPP) y el geranilgeranil difosfato (GGPP) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Química S.A y se disolvieron en etanol (concentración máxima de etanol en cultivo 0,44%). La 7-hidroxiestaurosporina (UCN-01) fue donada por el Dr. R.J. Schultz (National Cancer Institute, Bethesda, EEUU) y disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) (concentración máxima en cultivo 0,044%).

La 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) para la citometría de flujo se obtuvo de Sigma-Aldrich y el anticuerpo anti-BrdU-FITC se compró a Becton Dickinson (BD) Pharmingen. El resto de anticuerpos utilizados para citometría de flujo y para western blot se comentan más adelante en los apartados correspondientes (**Tabla 1** y **Tabla 3**). El resto de reactivos y disolventes fueron de calidad p.a. Los solventes para HPLC fueron de calidad HPLC y los patrones, de la máxima calidad disponible (p.a. o espectrometría). Los desoxirribonucleótidos (dA, dT, dC y dG) se compraron a Sigma-Aldrich Química S.A y se disolvieron en agua.

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Cultivos celulares

a) Línea celular:

Para la realización de este estudio se utilizaron las líneas celulares HL-60 (ECACC 98070106) y MOLT-4 (ATCC CRL-1582) de la Colección Europea de Cultivos Celulares, que crecen en suspensión. La línea celular HL-60 procede de la derivación de leucocitos de sangre periférica de una paciente de 36 años de edad con leucemia promielocítica aguda. La línea celular MOLT-4 procede de sangre periférica de un paciente varón, de 19 años de edad, con leucemia promielocítica aguda en recaída. El medio de cultivo base para el mantenimiento de estas líneas es RPMI-1640 suplementado con 10% LPDS, aunque presentan la capacidad de crecer en un medio libre de suero siempre y cuando este contenga suficiente

insulina y transferrina. Ambas líneas muestran la peculiaridad de que no se detienen en G0/G1 por efecto de la deficiencia de colesterol [4, 146] lo que nos ha permitido estudiar las acciones del colesterol mas allá de la fase G1 con facilidad.

b) Medio de cultivo y suplementos:

Las células de las dos líneas celulares empleadas se mantienen en 3 medios diferentes: un medio de congelación, un medio de descongelación y un medio de mantenimiento. El stock de células se mantuvo en un medio de congelación compuesto por una mezcla de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (v/v) en suero bovino fetal. Para la descongelación se empleó un medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 U/ml y gentamicina 100 µg/ml) (Gibco, BRL).

El mantenimiento de los cultivos y los experimentos del trabajo se llevaron a cabo en un medio libre de suero compuesto por RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado con transferrina 625 µg/ml (Roche), insulina 625 µg/ml, ácido linoleico 535 µg/ml, selenito sódico 625 µg/ml (Sigma-Aldrich) y albúmina humana 125 mg/ml (Grifols), medio al que denominaremos de ahora en adelante ITS+. Dicho medio fue a su vez suplementado con los mismos antibióticos empleados en el medio de descongelación.

c) Mantenimiento de los cultivos:

El mantenimiento se inicia con la descongelación de un vial de células conservadas en nitrógeno líquido. La descongelación se lleva acabo de forma rápida en un baño a 37 °C tras lo cual las células se siembran en frascos de 75 cm² en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% (v/v). Transcurridas 24 horas se recogen las células por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min para la eliminación de los posibles restos de DMSO y se resuspenden en medio fresco. En estas condiciones se mantienen durante 5 días aproximadamente hasta que adquieren un crecimiento exponencial. En este momento se cambia el medio de cultivo pasándose a ITS+ en el que se realizarán los diferentes experimentos del trabajo. En todo momento las células se mantienen a 37 °C en un incubador en atmósfera de 5% de CO₂.

Con el fin de alterar de forma mínima las condiciones de cultivo y mantener una tasa de proliferación normal, los cultivos se mantuvieron a una densidad celular no superior a las 5×10^5 células/ml. Para ello se realizaron recuentos periódicos, empleando un hemocitómetro, por el método de exclusión de azul tripán.

El proceso de mantenimiento de los cultivos se lleva a cabo 3 veces por semana, procediendo al menos dos veces al lavado con tampón fosfato salino (PBS) 1X y un cambio de medio.

3.2.2. Marcaje metabólico de los intermediarios de la biosíntesis de colesterol

3.2.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Fundamento

Dado que la ruta de biosíntesis de colesterol es una vía multienzimática en la que tienen lugar numerosas reacciones, el empleo de inhibidores que actúan sobre las diversas enzimas va a provocar la acumulación de uno o varios compuestos, lo que tendrá diferentes repercusiones sobre la célula. Resulta evidente la importancia de identificar dichos compuestos acumulados para determinar la implicación y acción de cada uno de los intermediarios sobre la proliferación celular.

La cromatografía es un método físico de separación donde las sustancias a separar interactúan en diferente grado con una matriz (fase estacionaria) que está contenida en una columna. Mediante una bomba de alta precisión se inyecta al sistema la fase móvil, inmiscible con la fase estacionaria, que arrastra diferencialmente aquellas sustancias. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y es la característica que va a permitir identificar al compuesto por comparación con el tiempo de retención de estándares conocidos.

Procesamiento y lectura de datos

Se llevaron a cabo dos separaciones cromatográficas a partir de extractos celulares: una de ácidos orgánicos y otra de esteroides. En ambos casos las células HL-60 se sembraron a una densidad de 4×10^5 células/ml y se preincubaron durante 2 horas en presencia o ausencia de Fmev. Transcurrido ese tiempo se añadieron a los cultivos 80 μCi de $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -acetato (Amersham Biosciences) prolongándose la incubación 8 h más. Después se sedimentaron las células mediante centrifugación y se lavaron con PBS 1X. A partir de este punto se procedió de forma diferente en función de los compuestos a detectar.

- Separación cromatográfica de ácidos orgánicos: Las células se resuspendieron en 150 μl de tampón de lisis (ver composición mas adelante, en punto 5.a de materiales y métodos) y se mantuvieron durante 90 min a 4 °C. El lisado resultante se inyectó directamente en un equipo HPLC, dotado de una bomba SYSTEM GOLD Programmable Solvent Module 126 (Beckman). La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna de fase reversa Phenosphere 5U SAX 80A (250x460 mm 5 micron, Phenomenex) empleando tres soluciones que constituyen la fase móvil: solución A (78% de KH_2PO_4 10 mM, 20% de acetonitrilo (ACN) y 2% de tetrahidrofurano (THF) a pH 4,35), solución B (70% de KH_2PO_4 300 mM, un 25% de ACN y 5% de THF a pH 4,35) y solución C (57% de solución A y 43% de solución C). La columna se eluyó a una tasa de flujo de 1 ml/min del minuto 0-8 con solución A, del minuto 8-45 con solución C y del 45-60 otra vez con solución A.
- Separación cromatográfica de esteroides: Las células se lisaron resuspendiéndolas en 500 μl de una solución de KOH al 10%. Los lípidos se extrajeron con cloroformo/metanol (2:1) y se separaron los lípidos no saponificables mediante saponificación con potasa etanólica y extracción en hexano [181]. Esta última fracción se inyectó en el equipo HPLC. La separación cromatográfica en este caso se llevó a cabo con una columna de fase reversa Luna 5 μm C18 (250 x 4.60 mm, Phenomenex). Los lípidos se eluyeron con acetonitrilo/agua (95:5 v/v) durante 37 min y a continuación se prosiguió la elución con metanol absoluto a un flujo de 1.2 ml/min.

En ambos casos, el efluente fue monitorizado simultáneamente por ultravioleta (UV) (detector de diodos, modelo 168; Beckman Instruments) y radioactividad (LB-506 C-1, Berthold). La identificación de los compuestos se realizó por comparación con los tiempos de retención de estándares puros y por análisis del espectro UV.

3.2.3. Proliferación celular

3.2.3.1. Ensayo de exclusión de azul tripan

Fundamento

Se empleó este ensayo por su sencillez y rapidez especialmente teniendo en cuenta que se trata de células en suspensión. La técnica evalúa la integridad de la membrana plasmática como una pieza clave en el mantenimiento de la viabilidad celular.

Procedimiento

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento específico de cada experimento se tomaron 20 µl de cultivo previamente homogeneizado y se mezclaron con otros 20 µl de azul tripán 0,4% (Sigma Aldrich). Se procedió al recuento de células como se indica para los recuentos de número de células excluyendo aquellas positivas para azul tripán que presentan fallos en la integridad de la membrana plasmática y por tanto no se consideran viables. Un volumen del cultivo se mezcla con azul tripan al 0,4% (p/v) en una relación 1:1 y se procede al conteo. El número de células por ml de cultivo se obtendrá realizando el siguiente cálculo:

$$\text{Nº de células/ml de cultivo: } \text{Nº obtenido en el conteo} \times 2 \times 10^4$$

En algunas ocasiones, tras la adición del azul tripán, el conteo de las células vivas se realizó utilizando el contador automático Countess (Invitrogen).

3.2.3.2. Ensayo colorimétrico XTT

Fundamento

Este ensayo permite determinar de forma rápida y sencilla la actividad metabólica de las células, considerando esta característica como determinante de la viabilidad celular. La técnica se basa en la reducción de la sal de tetrazol (de color amarillo) a sal de formazán (de color naranja) lo cual ocurre debido a la actividad metabólica de la célula. El formazán es soluble en soluciones acuosas y se cuantifica directamente en un espectrofotómetro midiendo la densidad óptica de las muestras. Un incremento del número de células viables supondrá un incremento de la actividad total de las deshidrogenasas mitocondriales de la muestra. Este incremento se correlaciona directamente con la cantidad de naranja de formazán formado.

Procedimiento

Las células se incubaron por triplicado en placas de 96 pocillos con los tratamientos correspondientes. Transcurrido el tiempo de tratamiento que se deseaba estudiar, cada condición se incubó en presencia de la solución de XTT a una concentración final de 0,3 mg/ml durante 4 horas. A continuación se midió la absorbancia correspondiente al formazán mediante un lector de placas SPECTRAFluor (Tecan).

3.2.3.3. Citometría de flujo

Fundamento

Las alteraciones en la progresión del ciclo celular, son un claro síntoma de que la proliferación celular está alterada. Si además podemos determinar el estado de la síntesis de ADN o la expresión de diversas proteínas en cada una de las fases del ciclo podemos hacernos una idea global de los efectos que el tratamiento empleado tiene sobre las células del cultivo. La citometría de flujo es la técnica de análisis celular que permite estudiar todos estos parámetros. Esta técnica implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia de las células cuando se les somete a un haz intenso de luz procedente de un láser. Para ello las células deben encontrarse en suspensión en un fluido y atravesar de una en una el rayo de luz. La difracción de la luz en sentido frontal permite evaluar el tamaño, mientras que la reflexión de la misma de manera lateral nos da una idea de la complejidad. Además, si previamente al análisis en el citómetro de flujo se marcan las células

con colorantes que emiten fluorescencia o anticuerpos monoclonales, marcados a su vez con moléculas fluorescentes, podremos estudiar características como la distribución del ciclo celular, la síntesis de ADN o la expresión de diferentes proteínas intracelulares.

3.2.3.3.1. Análisis del ciclo celular

Este análisis se basa en la capacidad del colorante yoduro de propidio de emitir fluorescencia tras unirse al ADN de forma estequiométrica. Aplicando esta propiedad al hecho de que la carga de ADN de una célula varía a lo largo del ciclo celular, podemos cuantificar la cantidad de material genético y posteriormente calcular el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, mostrándolo como un histograma. Como el yoduro de propidio tiene capacidad de interaccionar también con el ARN, durante el procesamiento se añade a los cultivos ribonucleasa A para evitar distorsiones en el análisis.

En todos los estudios de citometría a los que se hace referencia en este trabajo el análisis de las muestras se realizó empleando un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton-Dickinson) y los datos se analizaron con el programa WinMDI 2.8 (Build #13 01-19-2000, Copyright Joseph Trotter).

Procedimiento

Tras los tratamientos correspondientes se tomaron 1×10^6 células por condición, se recogieron por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min y se lavaron con 5 ml de PBS 1X volviendo a centrifugar en las mismas condiciones. Seguidamente se resuspendieron en 1 ml de etanol 70% para su fijación y permeabilización y se guardaron en estas condiciones a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 24 horas. A continuación se lavaron con PBS y se resuspendieron en una solución de PBS conteniendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de ribonucleasa A y 50 $\mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidio (ambos de Sigma Aldrich, EEUU) donde se incubaron durante 1 hora a 37°C . A continuación se analizaron las muestras en el citómetro de flujo.

3.2.3.3.2. Análisis de la síntesis de ADN

Se llevó a cabo un doble marcaje con yoduro de propidio y BrdU. Este último es un análogo de timidina que se une al ADN de nueva síntesis durante el proceso de replicación. La BrdU se añade a los cultivos durante un periodo de tiempo que

oscila entre los 30 y los 60 min según el caso, antes de la fijación de la muestra con etanol. Las células que incorporan BrdU de forma neta se considera que están en la fase de síntesis de ADN (S activa).

Procedimiento

Tras los diferentes tratamientos, se añadió al medio de cultivo BrdU (Sigma Aldrich) a una concentración final de 200 μ M durante el tiempo correspondiente según el experimento. A continuación las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con etanol 70% manteniéndolas a -20 °C durante al menos 24 horas. Seguidamente se lavaron con PBS 1X y se incubaron durante 20 min en HCl 2N a temperatura ambiente. Este tratamiento con HCl produce una desnaturalización transitoria del ADN que permite al anticuerpo alcanzar su diana. A continuación se resuspendieron en 1 ml de tampón $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,1M, pH 8,4 para neutralizar la reacción y se centrifugaron 5 min a 2000 rpm. Posteriormente se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron en 500 μ l de la solución de bloqueo compuesta por Tween 20 0,5% y suero normal de cabra (NGS) al 1% en PBS 1X, a temperatura ambiente durante 15 min. Después las células se centrifugaron durante 5 min a 2000 rpm y se resuspendieron en la solución de bloqueo con el anticuerpo primario para BrdU conjugado con FITC (fluorescein isothiocyanate) (Becton-Dickinson). En estas condiciones se mantuvieron durante 2 h a temperatura ambiente en oscuridad. Para terminar, las células se lavaron con Tween 20 al 0,5% en PBS y se tiñeron con yoduro de propidio como se indica para el análisis del ciclo celular (ver apartado anterior). Acabado el procesamiento, se analizaron las muestras en el citómetro de flujo.

3.2.3.3.3. Detección de proteínas intracelulares

Además de analizar el ciclo celular y la síntesis de ADN, la citometría de flujo nos permite estudiar la presencia de diferentes proteínas en la célula. Si el marcaje proteico, se combina además con el marcaje de ADN por yoduro de propidio, podemos determinar en qué fase del ciclo celular se encuentran las células que expresan una proteína de forma mayoritaria, o bien determinar si las células se encuentran en una determinada fase del ciclo por la presencia de una proteína que nos sirve de marcador, como es el caso de la fosfo-histona 3 que se

emplea como marcador mitótico. Las señales de fluorescencia detectadas por el citómetro, proceden de complejos antígeno/anticuerpo marcados con un fluorocromo y localizados en una célula, siendo la fluorescencia emitida proporcional a la cantidad de proteína en la célula.

Procedimiento

Las células sometidas a los diferentes tratamientos se recogieron y se lavaron dos veces con PBS 1X frío, tras lo cual se fijaron con paraformaldehído 2% durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron y se permeabilizaron con metanol 90% durante 24 horas a -20 °C. Seguidamente se incubaron en una solución de PBS 1X con Tritón X-100 al 0,1% durante 2 min a temperatura ambiente. Tras la permeabilización se incubaron en una solución de bloqueo (NGS al 1% en PBS 1X) durante 15 min y se resuspendieron en solución de bloqueo con el anticuerpo primario correspondiente durante 2 h a temperatura ambiente. Acto seguido se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con FITC durante 1 hora a 37 °C, tras lo cual se tiñeron con yoduro de propidio como se ha descrito previamente y se analizaron en el citómetro de flujo.

| Anticuerpos primarios | | | |
|-------------------------|----------|----------------------|----------|
| Nombre | Especie | Casa Comercial | Dilución |
| fosfo-H3 | Conejo | Santa Cruz Lab | 1:500 |
| γ H2AX | Ratón | Upstate®-MilliporeTM | 1:500 |
| Ciclina B1 | Ratón | Santa Cruz Lab | 1:500 |
| Anticuerpos secundarios | | | |
| Nombre | Síntesis | Casa Comercial | Dilución |
| Anti-ratón | Cabra | BD PharmingenTM | 1:500 |
| Anti-conejo | Cabra | BD PharmingenTM | 1:500 |

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la detección de proteínas intracelulares

3.2.3.3.4. Determinación de estrés oxidativo. Empleo de 2'-7-diclorofluoresceína diacetato

Fundamento

La molécula de CM-H₂DCFDA (mezcla de las formas acetiladas de los ésteres 5 (y 6)-clorometil-2'-7-diclorofluoresceína diacetato) se incorpora al citosol de las células donde las esterasas eliminan los radicales acetato quedando

cargados negativamente, lo que les impide salir de la célula. Estas formas que quedan en el interior de la célula no emiten fluorescencia, pero si el tratamiento produce un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula, se oxidan dando lugar a diclorofluoresceína que si es una molécula fluorescente. Esta fluorescencia será detectada por el citómetro.

Procedimiento:

Para la medida de una posible actividad oxidativa en las células se recogieron 1×10^6 células por condición y se resuspendieron en una solución de CM-H₂DCFDA 10 μ M en PBS 1X. En estas condiciones se incubaron durante 45 min a 37 °C y posteriormente se mantuvieron en hielo mientras se analizaban en el citómetro de flujo. De nuevo, los resultados se analizaron con el programa WinMDI 2.8.

3.2.4. Electroforesis e inmunodetección

Fundamento

El western blot es una técnica analítica que se emplea para la detección de proteínas. La técnica se basa en la separación de proteínas según su peso molecular mediante una electroforesis en un gel de acrilamida. Una vez finalizada la electroforesis las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa sobre la que posteriormente se realizarán las inmunodetecciones para las proteínas concretas que se desean estudiar. Por último, se lleva a cabo una cuantificación por análisis densitométrico de las bandas resultantes.

Procedimiento

Se trata de un protocolo que consta de 6 partes:

- a) Preparación de la muestra
- b) Electroforesis en gel
- c) Electrotransferencia
- d) Bloqueo
- e) Detección (método en dos pasos)
- f) Revelado y análisis

a) Preparación de la muestra

Una vez tratadas las muestras se recogieron por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min y se lavaron con PBS 1X. Tras eliminar cuidadosamente los restos de PBS se resuspendieron en 100 μ l de tampón de lisis por cada 8×10^6 células (composición en **Tabla 2**) y se incubaron durante 90 min a 4 °C. Una vez transcurrido el tiempo de lisis se centrifugaron y se guardó el sobrenadante para la cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico. Esta técnica se llevó a cabo empleando un kit comercial (BCA Protein Assay Kit, Pierce) en el que se combina la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ de las proteínas en un medio alcalino, con la detección colorimétrica del Cu^+ empleando como reactivo el ácido bicinconínico (BCA). La reacción de dos moléculas de BCA con una molécula de Cu^+ da un color morado que medido a una longitud de onda de 562 nm da un valor de absorbancia directamente proporcional al incremento de proteínas dentro de un amplio rango de trabajo. Para valorar la cantidad de proteína presente en la muestra se preparó una curva patrón empleando concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (Sigma Aldrich) lo que nos permitió elaborar una recta patrón de la que interpolar la cantidad de proteína presente en cada muestra. Para la lectura de los datos se empleó un lector de placas SPECTRAFluor obteniendo los valores para el cálculo del volumen necesario para cargar 50 μ g de proteína en cada carril del gel. La preparación de las muestras se completó añadiendo tampón de carga e incubando a 100 °C para su desnaturalización durante 5 min en un termoblock Stuart® SBH 130D.

b) Electroforesis

En primer lugar se procedió a preparar un gel de acrilamida dividido en dos partes: una porción superior concentradora con Tris-HCl 1M a pH 6.8 y 5% de acrilamida y una porción inferior separadora con Tris-HCl 1M a pH 8.7 y el 12% de acrilamida. La electroforesis se llevó a cabo siguiendo el método de Laemli [182] en condiciones desnaturalizantes y reductoras que aseguran que las proteínas únicamente se separan en función del tamaño ya que pierden las estructuras secundaria y terciaria. Así, la electroforesis se llevó a cabo en un tampón que contenía tris-glicina 1X y SDS 1% (p/v) en agua bidestilada durante 2 horas a 100 V y temperatura ambiente.

| Tampón de lisis | |
|------------------------|---------------|
| Compuesto | Concentración |
| Antipaina | 10 mg/L |
| Aprotinina | 40 mg/L |
| Benzamidina | 1 mM |
| Cloruro Potásico | 120 mM |
| Di-tio-tritol | 1 mM |
| EDTA | 1 mM |
| EGTA | 2 mM |
| Fluoruro Sódico | 100 mM |
| Inhibidor de proteasas | 1 mM |
| Leupeptina | 1 mg/L |
| Molibdato Sódico | 20 mM |
| Nonidet P40 | 0,5% (v/v) |
| Ortovanadato Sódico | 2 mM |
| Tris-HCl | 20 mM |
| Tritón® X 100 | 0,1% (v/v) |
| β-glicerolfosfato | 20 mM |

Tabla 2. Composición del tampón de lisis empleado en la técnica de *western blot*

c) Electrotransferencia

Las proteínas se transfirieron desde el gel (donde ya habían quedado separadas en función de su peso molecular) a una membrana de nitrocelulosa Amersham™ Hybond™-ECL (GE Healthcare) en la que se producen interacciones no covalentes y de naturaleza hidrofóbica. La electrotransferencia se basa en el empleo de una corriente eléctrica y un tampón de transferencia que hacen “migrar” a las proteínas del polo negativo al polo positivo y se queden unidas a la membrana. El tampón de transferencia tenía la misma composición que el de electroforesis pero no se le añadió SDS y si metanol absoluto al 20% (v/v)). El proceso de transferencia se llevó a cabo durante 1 hora a 100 V y 4 °C.

d) Bloqueo

Dado que a la membrana pueden unirse proteínas de forma inespecífica, es preciso bloquear los lugares de unión que han quedado libres tras la transferencia. Para ello se empleó una solución de bloqueo (lactoalbúmina al 10% (v/v) en TBS-Tween 20 (Sigma Aldrich) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las proteínas de la solución de bloqueo se unen a todos aquellos lugares de unión de la membrana que no estén ya ocupados por las proteínas transferidas desde el gel. De

este modo aumentamos la probabilidad de que el anticuerpo se uniera a su antígeno específico.

e) Detección

El siguiente paso fue comprobar la presencia de la proteína de interés en la membrana. Para ello se llevó a cabo el método de detección en dos pasos: unión del anticuerpo primario y unión del anticuerpo secundario. En primer lugar se incubó la membrana en agitación moderada en la solución de bloqueo (1%, v/v) que contenía una dilución determinada de anticuerpo primario, a 4 °C durante toda la noche. Una vez retirado el anticuerpo primario y tras tres lavados de 10 min cada uno, con la solución de TBS-Tween 20, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente, diluido en la solución de bloqueo (1%, v/v) durante 1 h a temperatura ambiente.

f) Revelado y análisis

El revelado del marcaje con el anticuerpo se realizó con el luminol del kit Immun-Star HRP (Bio-Rad Laboratories) visualizándolo con el equipo VersaDoc™ Model 4000 Imagin System (Bio-Rad Laboratories) y análisis densitométrico de las bandas de proteínas mediante el programa de análisis de imagen Quantity One 4.5.2 1-D Imagin Software.

Los datos de cantidad de proteína fueron normalizados respecto al control de carga (γ -tubulina, β -actina o GAPDH según el caso) que se detectó en las mismas membranas tras lavarlas con glicina 1M a pH 3 durante 40 min a 50 °C para eliminar la actividad peroxidasa.

| Anticuerpos primarios | | | |
|---------------------------|----------|----------------|----------------|
| Nombre | Especie | Casa Comercial | Dilución |
| fosfo-p38 (Thr180/Tyr182) | Conejo | Cell Signaling | 1:1000 |
| p38 MAPK | Conejo | Cell Signaling | 1:1000 |
| fosfo-JNK (pT183/pY185) | Ratón | BD Pharmingen™ | 1:500 |
| JNK | Conejo | Santa Cruz Lab | 1:1000 |
| difosfo-ERK-1&2 | Ratón | SIGMA | 1:2000 |
| ERK-1&2 | Conejo | SIGMA | 1:2000 |
| fosfo-Chk1 S345 | Conejo | Cell Signaling | 1:1000 |
| fosfo-Chk1 S317 | Conejo | Abcam | 1:1000 |
| Chk1 | Ratón | Santa Cruz Lab | 1:1000 |
| fosfo-Chk2 (Thr68) | Conejo | Cell Signaling | 1:1000 |
| Chk2 | Ratón | BD Pharmingen™ | 1:1000 |
| fosfo-AMPK | Conejo | Cell Signaling | 1:1000 |
| AMPKalpha | Ratón | Cell Signaling | 1:1000 |
| Anticuerpos secundarios | | | |
| Nombre | Síntesis | Casa Comercial | Dilución |
| Anti-ratón | Cabra | Santa Cruz Lab | 1:1000/ 1:2000 |
| Anti-conejo | Cabra | Santa Cruz Lab | 1:1000/ 1:2000 |
| Anti-cabra | Ratón | Santa Cruz Lab | 1:1000 |

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmunodetección de proteínas

3.2.5. Transfección de células HL-60 con un siRNA

Fundamento

El proceso de transfección consiste en la introducción de material genético externo en una célula. Por otro lado, siRNA son las siglas correspondientes a “small interfering RNA” o ARN pequeño de interferencia que es un ARN altamente específico para la secuencia de nucleótidos de su ARN mensajero diana, interfiriendo por ello con la expresión del gen respectivo. Así, la transfección de células con un siRNA supondrá una reducción de la expresión del gen de estudio que nos permitirá dilucidar la implicación del producto de dicho gen en los efectos observados.

Procesamiento

Para el silenciamiento del gen CHEK1, cuyo producto es la proteína Chk1, se empleó un siRNA comercial (Silencer® Select Validated siRNA, ID: s503, Ambion) cuyas secuencias son:

5'-GCAUGGUAUUGGAAUAACUtt-3' (sentido)

5'-AGUUAUUCCAAUACCAUGCag-3' (antisentido)

Como control negativo se utilizó el siRNA Negativo #1 (Silencer® Select Negative Control #1 siRNA, Ambion).

La transfección de las células HL-60 se llevó a cabo por electroporación. Para ello se tomaron no menos de 10×10^6 células por condición y se resuspendieron en 75 μ L del tampón de electroporación siPORTTM siRNA Electroporation Buffer (Ambion) sobre el que se añadieron 2 μ g del siRNA correspondiente en cada caso. La electroporación se realizó en una cubeta de 4 mm (BTX modelo 640), aplicando 195 mV durante 40 milisegundos en un electroporador Electro Square PoratorTM ECM830 (BTX®, Genetronic Inc.). Después, las células se incubaron durante 15 min a 37 °C en la misma cubeta y se sembraron en un medio sin antibióticos. Tras 15 horas de incubación, las células se lavaron y se sembraron en medio con antibióticos y se les aplicaron los tratamientos correspondientes.

3.2.6. Inmunodetección de las proteínas intracelulares

Fundamento

La inmunocitoquímica es una técnica que permite detectar proteínas intracelulares sin alterar la integridad de la célula. Si en el apartado 5 exponíamos que por western blot podemos determinar la presencia de una proteína en un lisado celular y determinar si esta se incrementa o disminuye por diferentes tratamientos, mediante inmunocitoquímica podremos, además, determinar su localización en la célula. En el presente trabajo se ha llevado a cabo el estudio de dos proteínas mediante esta técnica: la forma fosforilada de la histona H2AX y la proteína α -tubulina.

La fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX) indica una rotura de la doble cadena de ADN. Esta proteína puede observarse por inmunodetección lo que la convierte en un biomarcador de importancia en el estudio del daño en ADN (Kuo y Yang, 2008).

Tubulina es el nombre que recibe comúnmente el heterodímero formado por dos subunidades (α y β) que al ensamblarse de manera altamente organizada

genera uno de los principales componentes del citoesqueleto, los microtúbulos. Así, el estudio por inmunocitoquímica de α -tubulina nos permitirá comprobar la integridad del citoesqueleto y las posibles alteraciones en la formación del huso mitótico.

Procedimiento

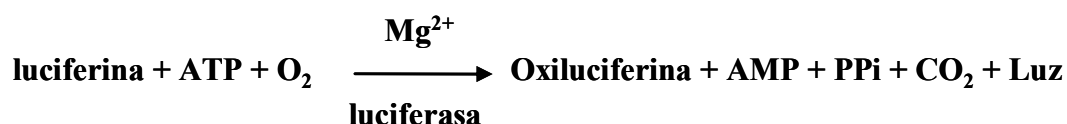
Como ya se ha mencionado, las células HL-60 son una línea celular que crece en suspensión. Esto supone que debe hacerse un pretratamiento para fijarlas a los cubreobjetos que permita su posterior marcaje. Para ello tratamos los cubreobjetos con poly-D-lisina 5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma Aldrich). Se toman 5×10^5 células por condición y se depositan sobre los cubreobjetos tratados. En estas condiciones se incuban a 37 °C durante 10 min y se comprueba su adhesión al sustrato. Posteriormente se fijan con paraformaldehído en PBS 1X al 10% (v/v) durante 10 min. Tras un lavado con PBS 1X se permeabilizaron las muestras durante 5 min con Tritón® X 100 al 5% (v/v) en PBS 1X. A continuación se bloquearon las células empleando una solución de albúmina de suero bovino en PBS al 5% (v/v) durante 10 min y se realizó la incubación con anti- γH2AX durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Tras un nuevo lavado con PBS se volvió a permeabilizar y bloquear incubando ahora con el anticuerpo secundario durante 45 min a 37 °C también en cámara húmeda. Finalmente se realizó una contratinción para núcleo con Hoechst 33258 y se montó con medio de montaje ProLong® antifade Gold reagent.

La observación y recuentos de células se llevaron a cabo empleando un microscopio óptico de epifluorescencia Leica DMI 3000B equipado con una fuente de luz compacta EL6000 y filtros de excitación azul ($\lambda=470\text{-}490\text{ nm}$) para la Histona y la tubulina y ultravioleta ($\lambda=360\text{-}370\text{ nm}$) para los núcleos. El microscopio incorporaba filtros de barrera de longitudes de onda 520 y 420 nm respectivamente. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara CCD Leica DFC310FX y procesadas con el software Leica Application Suite 3.5.0 and Adobe Photoshop 9.0 (Adobe Systems Inc., USA).

3.2.7. Determinación del contenido celular de ATP

Fundamento

El trifosfato de adenosina o adenosín trifosfato (ATP) es el nucleótido fundamental en la obtención de energía celular. La medida de su concentración se realiza mediante un ensayo basado en el requerimiento de ATP de la enzima luciferasa para la producción de luz según la siguiente reacción:



Así, la cantidad de luz detectada será directamente proporcional al contenido de ATP de la muestra.

Procedimiento

Cada condición se divide en dos: una para el estudio del contenido de ATP y la otra para la cuantificación de proteínas con el kit de BCA, previo tratamiento de las células con tampón de lisis (ver apartado 5.a). La muestra que será empleada para determinar el contenido de ATP se lava dos veces con un tampón 50 mM TrisHCl/ 154 mM NaCl a pH 7.4. Tras los lavados las muestras se resuspenden en agua hirviendo y se calientan 10 segundos mas. A continuación se centrifugan a 12000 rpm durante 15 min en frío y se toma el sobrenadante para la determinación de ATP. Para ello se emplea el Kit para determinación de ATP (Invitrogen- Molecular Probes™) que se basa en realizar una mezcla 1:1000 de la muestra en una mezcla de reacción que contiene un 5% de tampón de reacción 20X, un 5% de D-luciferina 3 mg/ml y un 1% ditiotreitól (DTT) un agente reductor. Todos estos componentes son suministrados en el kit.

Finalmente la emisión de luz es leída en un lunimómetro de tubo simple Sirius (Berthold) en el que cada tubo se lee durante un total de 5 minutos, tomando medidas cada 30 segundos y tomando como valor la media de todas las medidas. Para valorar la cantidad de ATP en la muestra se preparó una recta patrón a partir de concentraciones de ATP conocidas empleando una solución estándar suministrada con el kit. Los datos de concentración de ATP de las muestras se extrapolan de la dicha recta patrón y se representan respecto a la concentración de proteína de cada muestra.

3.2.8. Estudio de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa en tiempo real

Fundamento

La PCR cuantitativa o PCR en tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y poder cuantificar el producto de la amplificación de un gen. En el caso de la RT-PCR, previamente se lleva a cabo una retrotranscripción (RT) del ARN mensajero para obtener el ADNc que servirá de molde. Además, a diferencia de la PCR convencional, esta técnica permite, mediante la adición de una sustancia marcada con un fluorocromo a la mezcla de reacción, medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición se realiza después de cada ciclo de amplificación, de ahí el nombre de PCR tiempo real.

Procedimiento

Para poder llevar a cabo el protocolo de RT-PCR previamente es necesario hacer una extracción de ARN total y a partir de este ARN mensajero.

a) Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total, una vez sometidas las células a los tratamientos pertinentes se lisan en 1 ml TRI REAGENT™ (Sigma Aldrich) por cada $5-10 \times 10^6$ células y se congelan a -80°C durante una hora. A continuación se descongelan a temperatura ambiente y se añaden 200 μl por cada ml de TRI REAGENT™ mezclando bien con vortex. Se dejan reposar 15 min a temperatura ambiente y se centrifugan a 12000 g durante 15 min a 4°C . Tras la centrifugación se observan 3 fases: la parte inferior contiene las proteínas y otros componentes orgánicos, la intermedia el ADN y la acuosa superior el ARN. Esta última se transfiere a un nuevo tubo y se mezcla con 500 μl de isopropanol (Sigma Aldrich) por cada ml de TRI REAGENT™. De nuevo se mezcla bien con vortex y se deja reposar otros 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se centrifugan en las mismas condiciones que anteriormente. El ARN sedimentará en el fondo del tubo, por lo que se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 1 ml de etanol al 75%. A

continuación se centrifuga durante 5 min a 12000 g y se descarta el etanol dejando secar el precipitado. Una vez seco se resuspende en agua DEPC precalentada a 65°C. Para asegurar la correcta disolución del precipitado las muestras se calientan durante 15 min a 65°C.

Finalmente se mide la concentración de ARN en un espectrofotómetro NanoDrop y se comprueba su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

b) Extracción de ARN mensajero

El ARN mensajero se aísla a partir de 100 µg de ARN total mediante columnas formadas por bolas de poliT del kit de purificación GenElute™ ARNm MiniPrep (Sigma Aldrich) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN mensajero se precipita con etanol/acetato sódico (3:0,1) y glucógeno durante 16-20 horas a -20°C. Tras la precipitación el ARN mensajero se centrifuga y se lava con 1 ml de etanol 75% volviendo a centrifugar para descartar el etanol y, del mismo modo que se hace con el ARN total, resuspender en agua DEPC precalentada a 65°C. De nuevo, para asegurar la disolución del ARN mensajero se incuban a 65°C durante 5 min. Por último, el ARN mensajero se cuantifica en un espectrofotómetro NanoDrop y se comprueba la integridad del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

c) Reacción de retrotranscripción y PCR cuantitativa en tiempo real

La reacción de retrotranscripción (RT) se lleva a cabo a partir de 500 ng de ARN mensajero con el kit Primer Script RT Reagent (Takara) en un volumen final de 10 µl. Las condiciones de reactivos se detallan en la siguiente tabla:

| Reactivo | Volumen (µl) | Concentración final |
|----------------------------------|--------------|---------------------|
| 5X PrimerScript™ Buffer | 2 | 1X |
| PrimerScript™ RT Enzyme MixI | 0,5 | |
| Oligo dT Primer (50 µM) | 0,5 | 25 pmoles |
| Random 6 primers (100 µM) | 0,5 | 50 pmoles |
| ARN total (500 ng) | | |
| H ₂ O libre de RNAsas | Hasta 10 µl | |

La reacción consiste en una incubación de 15 min a 37°C y una inactivación de 5 segundos a 85°C.

La PCR cuantitativa en tiempo real se lleva a cabo empleando el kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) en un termociclador Light Cycler® 480 II y los resultados se analizan con la plataforma informática del termociclador (Light Cycler® 480 software, versión 1.5). El protocolo de amplificación se detalla a continuación:

| Fase | Temperatura (°C) | Tiempo | Tasa de rampa (°C/s) |
|---|------------------|--------|----------------------|
| Preincubación | 95 | 5 min | 4,4 |
| Incubación | 95 | 10 seg | 4,4 |
| | 60 | 15 seg | 2,2 |
| | 72 | 15 seg | 4,4 |
| Curva de Melting (curvas de disociación) | 95 | 5 seg | 4,4 |
| | 65 | 1 min | 2,2 |
| | 97 | --- | 0,11 |
| Enfriamiento | 40 | 10 seg | 1,5 |

Los resultados de expresión relativa de los genes analizados se obtienen calculando el incremento de CT (Δ CT) corregido por la eficiencia del cebador y normalizado por el control invariable, o house-keeping, RPLP0 (gen de la proteína ribosomal larga P0).

Los cebadores empleados en este trabajo fueron:

| Nombre del gen | Secuencia sentido | Secuencia antisentido |
|----------------|------------------------------|-----------------------------|
| HMGCR | 5'-GGACCCCTTTGCTTAGATGAAA-3' | 5'-CCACCAAGACCTATTGCTCTG-3' |
| LDLR | 5'-ACTGCGAAGATGGCTCGGATG-3' | 5'-CATCTGACCAGTCCCAGGAGT-3' |
| MVD | 5'-GAAGCGGAGGAACACACGG-3' | 5'-GTGTAGGCTAGGCAGGCATA-3' |

3.2.9. Análisis estadísticos

Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar (DE) o error estándar (EE) de la media. Para la comparación estadística entre grupos se aplicó el test de ANOVA para muestras repetidas, excepto en el caso de ANOVA de tres vías que se realizó un análisis para medidas no repetidas. Para aquellos casos en que las diferencias fueron significativas se aplicaron diferentes test post-hoc. Todo ello se realizó con 3 programas estadísticos fundamentalmente: GraphPad Prism 4.00, SigmaStat 2.03 y SPSS.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 EFECTO DEL FLUOROMEVALONATO SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE COLESTEROL

El primer aspecto que se abordó fue el efecto del Fmev sobre la biosíntesis de colesterol en las células de la línea celular HL-60, que presentan una elevada tasa de proliferación y, consecuentemente, también de síntesis de colesterol. El estudio se abordó mediante la incorporación de [^{14}C]-acetato a los diferentes intermediarios de la ruta. Dado que el Fmev es un potente inhibidor de la MVD [22], se analizaron tanto los ácidos orgánicos como los esteroides, mediante las correspondientes técnicas de separación por HPLC.

4.1.1. Estudio de la acumulación de compuestos de la vía del mevalonato

Se observó que en presencia de Fmev (100 y 200 μM) se acumulaban una serie de compuestos, especialmente los picos 1, 2 y 3, que no estaban presentes en la condición control (**Figura 1.A**). Cuando las muestras se trataron con KOH 10% para hidrolizar los grupos fosfato, dichos picos desaparecieron, lo que indicaba que se trataba de compuestos fosforilados. El pico 2 se identificó como IPP/DMAPP mediante la utilización de [^{14}C]-IPP como patrón. Los picos 1 y 3 corresponden a mevalonato difosfato (MVPP) y a mevalonato fosfato (MVP), respectivamente [183]. La acumulación de MVPP está de acuerdo con la inhibición de la MVD descrita, al ser aquel su sustrato. La presencia de IPP/DMAPP radiactivo en las células tratadas (incluso con la dosis de 200 μM) indica que la inhibición de dicha enzima no es total.

4.1.2. Efecto sobre la síntesis de esteroides

Para determinar la eficacia de la inhibición de la MVD por efecto del Fmev, se analizó la incorporación de radiactividad a esteroides mediante HPLC en fase reversa. En este caso se pudo comprobar como la síntesis de colesterol se reducía en las células tratadas con Fmev respecto a las células de la condición control, aunque no se anulaba con ninguna de las dosis utilizadas (**Figura 1.B**).

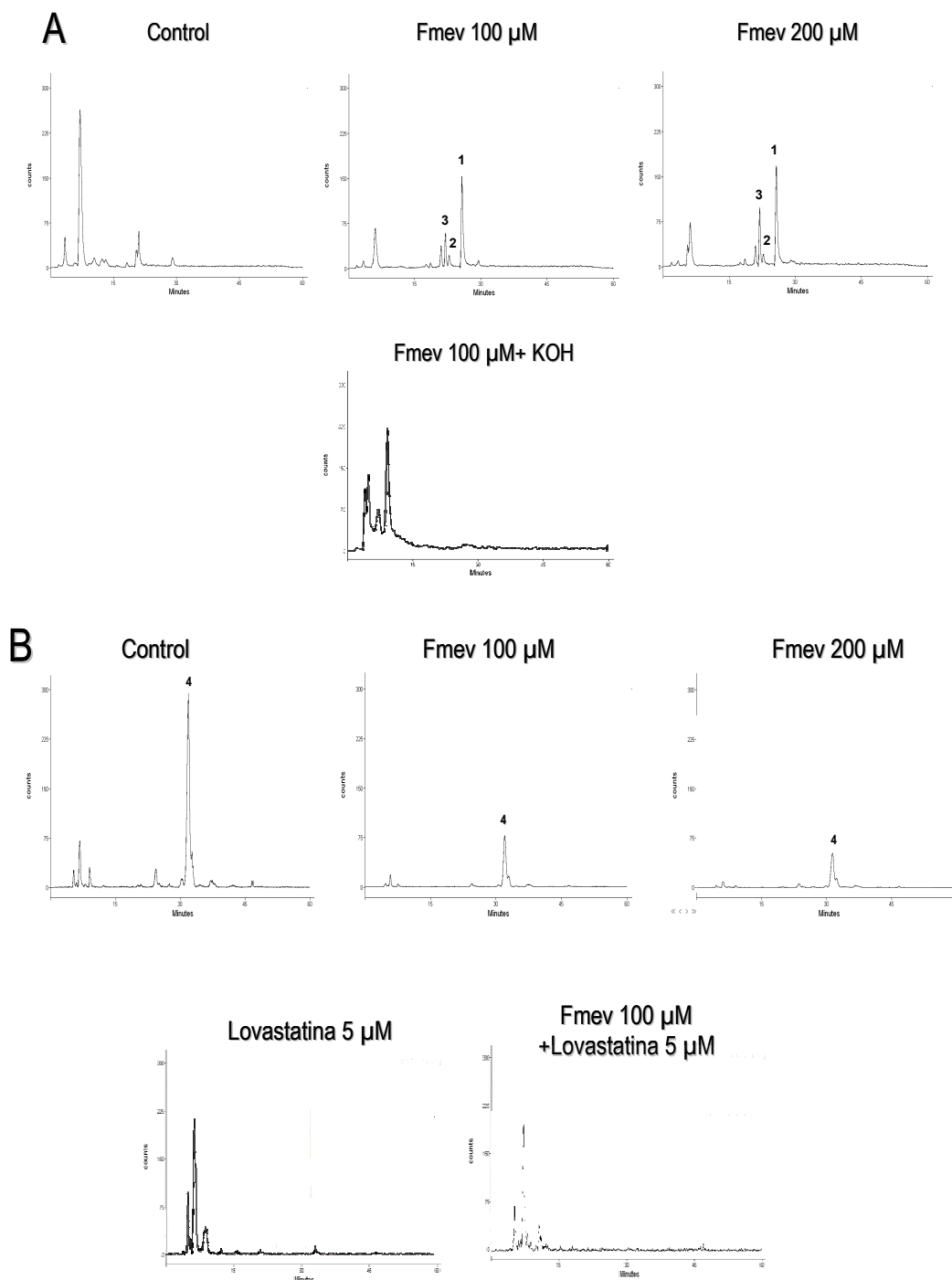


Figura 1. Efecto del fluoromevalonato sobre la biosíntesis de colesterol. **A.** Se analizó por HPLC la radioactividad incorporada a los intermediarios fosforilados de bajo peso molecular (ácidos orgánicos e isoprenoides no esteroles) de la vía del mevalonato en células HL-60 tratadas con diferentes dosis de Fmev (100 μ M y 200 μ M). Además se trataron las muestras con KOH durante las 24 horas previas al análisis por HPLC para la eliminación de los grupos fosfato. **B.** Se analizó la incorporación de radiactividad a esteroides tras el tratamiento con Fmev 100 y 200 μ M. Se muestran como controles positivos de la inhibición de la síntesis de colesterol muestras tratadas con lovastatina 5 μ M en combinación o no con Fmev. Picos identificados: (1) mevalonato difosfato; (2) isopentenil difosfato/dimetilalil difosfato; (3) mevalonato fosfato; (4) colesterol.

Los resultados confirman, por lo tanto, que en nuestras condiciones el Fmev reduce, pero no bloquea, la biosíntesis de colesterol. En comparación, la

lovastatina 5 μM inhibió por completo la síntesis de colesterol, tanto cuando se añadía a los cultivos sola, como en combinación con Fmev.

4.2 EFECTOS DEL FLUOROMEVALONATO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

4.2.1. Estudio del efecto del fluoromevalonato sobre la proliferación de diferentes líneas celulares (ensayos XTT)

Habiendo comprobado que el Fmev inhibía la conversión de mevalonato 5-difosfato en isopentenil difosfato, el siguiente paso consistió en determinar su efecto sobre la proliferación y viabilidad de diferentes líneas celulares. Para ello se emplearon seis líneas celulares diferentes: dos líneas leucémicas, la línea promielocítica HL-60 y la línea linfoblástica MOLT4, una línea derivada de neuroblastoma, SH-SY5Y, una línea derivada de hepatocarcinoma, Hep G2, y dos líneas derivadas de cáncer de mama con diferente dotación para la proteína p53, MDA-MB-231 y MCF7, mutante y salvaje respectivamente, todas ellas de origen humano. El estudio se llevó a cabo empleando el ensayo de proliferación celular con XTT, que se basa en actividad metabólica de las células viables. Las células se incubaron durante un total de 72 horas en presencia de dos concentraciones de Fmev, 100 y 200 μM , analizando la proliferación de los cultivos cada 24 horas. Como se observa en la **Figura 2.A**, las diferentes líneas celulares presentan diferentes respuestas al inhibidor. Así, mientras que las líneas HL-60 y MOLT4 ven inhibida su proliferación desde las primeras 24 horas de tratamiento, incluso a la dosis mas baja empleada, las líneas celulares SH-SY5Y y HepG2 requirieron mas tiempo y mayor dosis para que se produjera una inhibición de proliferación respecto a las células control. Las células MDA-MB-231 y las MCF7 apenas se vieron afectadas por el Fmev lo que indicaría que el efecto no depende de la dotación de p53. Parece, sin embargo, que las células con una mayor capacidad proliferativa, como es el caso de las líneas HL-60 y MOLT4, presentan una mayor sensibilidad a los efectos del compuesto. En base a estos resultados se decidió emplear la línea celular HL-60 para profundizar en los mecanismos que subyacen a dichos efectos. Además de la observada respuesta a Fmev, estas células presentan la peculiaridad de que no se detienen en la fase G0/G1 del ciclo celular por

deficiencia de colesterol [4, 146], lo que nos permite estudiar las acciones del colesterol y sus derivados mas allá de G1.

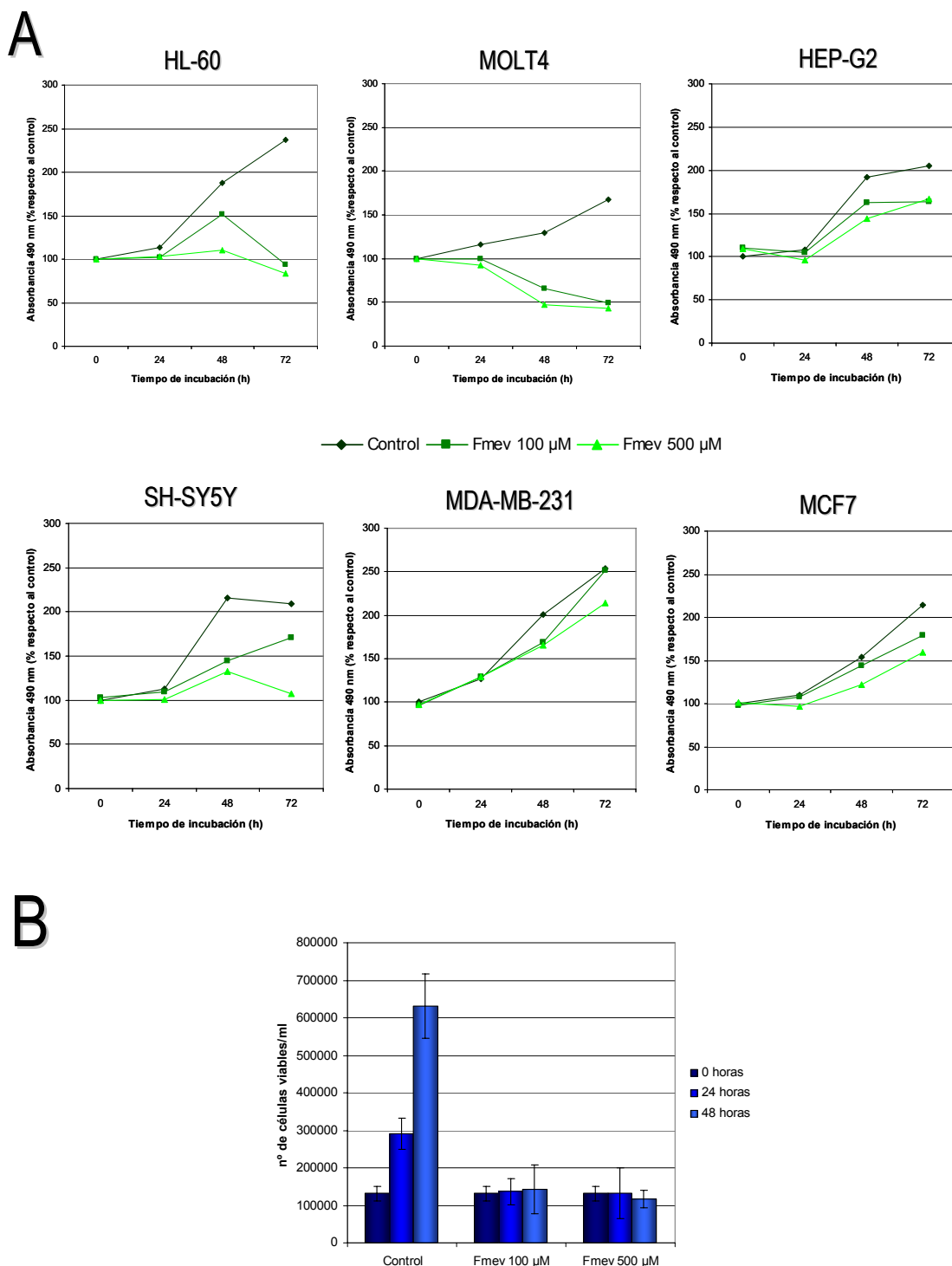


Figura 2. Efecto del fluoromevalonato sobre la proliferación de diferentes líneas celulares. **A.** Se estudió mediante ensayo XTT la proliferación de las líneas celulares HL-60, MOLT-4, SH-SY5Y, HEP-G2, MDA-MB-231 y MCF7 durante 24, 48 y 72 en presencia de dosis de Fmev 100 y 500 µM. Los datos mostrados representan el porcentaje de absorbancia a 490 nm respecto al control a tiempo 0. **B.** Empleando células HL-60 se estudió el efecto del Fmev 100 y 500 µM sobre el número de células viables por ml de cultivo a las 24 y 48 horas de tratamiento (media ± DE).

Para tener una visión más completa de los efectos que ejercía el Fmev sobre la proliferación de las células HL-60, se llevó a cabo un estudio del número de células viables a las 24 y 48 horas de tratamiento. El método de análisis empleado fue el de exclusión de azul tripán empleando un hemocitómetro. Los resultados se muestran en la **Figura 2.B**. Puede observarse que, en la condición control, el número de células se incrementaba al doble cada 24 h aproximadamente. En presencia de Fmev 100 ó 500 μ M las células HL-60 dejaron de proliferar ya en las primeras horas de incubación, manteniéndose el número de células viables. Es interesante señalar que si bien no aumentaron en número, tampoco hubo descenso, lo que es indicativo de que el Fmev no tuvo un efecto citotóxico sobre las células a los tiempos y concentraciones estudiados y sí un efecto citostático.

4.2.2. Análisis de la progresión del ciclo celular de células HL-60 tratadas con fluoromevalonato

4.2.2.1. Análisis del efecto de diferentes dosis de fluoromevalonato y diferentes tiempos de tratamiento

Primeramente se analizó la distribución del ciclo celular junto con la síntesis de ADN en células asincrónicas. Con este último fin se empleó BrdU, un análogo de timidina que se incorpora al ADN durante la replicación, de manera que, añadido a los cultivos durante 1 hora antes de la toma de la muestra, la cantidad de BrdU detectada será directamente proporcional a la tasa de síntesis de ADN. Como se muestra en la **Figura 3**, en condiciones control las células presentan una distribución del ciclo celular en la que la mayor proporción de ellas se encuentran en la fase G₀/G₁, con un contenido de ADN 2C, y no incorporan BrdU. Otra pequeña población de células, con contenido 4C, tampoco incorporan BrdU (células en fases G₂ o M) y una población de células con contenido intermedio de ADN entre 2C y 4C (fase S) que incorporan BrdU (fase S activa).

La incubación de las células HL-60 con dosis crecientes de Fmev durante 12 horas, produjo un retraso del ciclo celular en la fase S, determinado por un bloqueo de la incorporación de BrdU aproximadamente hacia la mitad de la fase. Como se puede observar, ninguna de las concentraciones empleadas permitió que se

alcanzara la fase G2/M como lo refleja la práctica ausencia de células con contenido de ADN 4C.

A continuación, y tomando como referencia la dosis de 100 μM , se estudió el efecto del inhibidor a diferentes tiempos. Los resultados revelan una acumulación de las células en la fase S del ciclo así como una reducción de la incorporación de BrdU al ADN aproximadamente hacia la mitad de la fase de síntesis a medida que aumentaba el tiempo de incubación con Fmev (**Figura 3**). El efecto es dependiente del tiempo ya que a las 6 horas las células comienzan a acumularse en la fase S pero continua habiendo una población de células en la fase G2/M del ciclo.

Para confirmar los resultados se llevó a cabo una sincronización de las células en la fase G1 del ciclo tratándolas con timidina durante 15 horas. A continuación se liberaron del efecto de la timidina resuspendiéndolas en medio fresco en presencia o ausencia de Fmev. Como se puede observar en la **Figura 4**, tras la eliminación de la timidina las células transitan a través de la fase S y llegan a G2/M recuperando una normal distribución del ciclo celular tras 24 horas. La adición de Fmev, en cambio, impidió que las células alcanzaran la fase G2/M permaneciendo en la fase S incluso 24 horas después de la liberación de timidina.

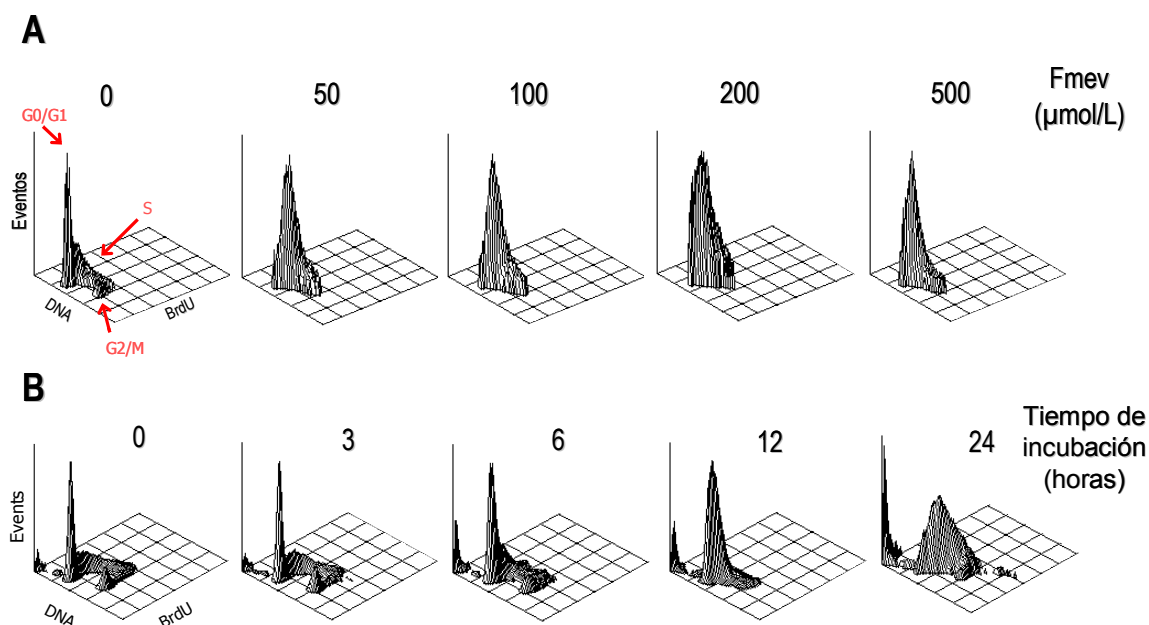


Figura 3. Estudio del efecto del fluoromevalonato sobre la distribución del ciclo celular y la síntesis de ADN. Las células HL-60 se incubaron en presencia o ausencia (control) de Fmev. Una hora antes de la toma de cada muestra se añadió BrdU 100 μM al medio de cultivo. Las células se procesaron para su análisis mediante citometría de flujo. **A.** Análisis del efecto a diferentes dosis. **B.** Análisis del efecto a diferentes tiempos empleando una dosis fija de 100 μM .

Por tanto, podemos concluir que la inhibición de la enzima MVD por efecto del Fmev detiene la proliferación de las células HL-60 por inhibición del avance a través de la fase S del ciclo.

2.2.2 Liberación del efecto de fluoromevalonato.

A fin de comprobar si el efecto del Fmev era reversible al ser este eliminado del medio de cultivo, se procedió a tratar las células con el inhibidor durante 15 horas tras las cuales se dejaron progresar a través del ciclo celular durante 10 horas más.

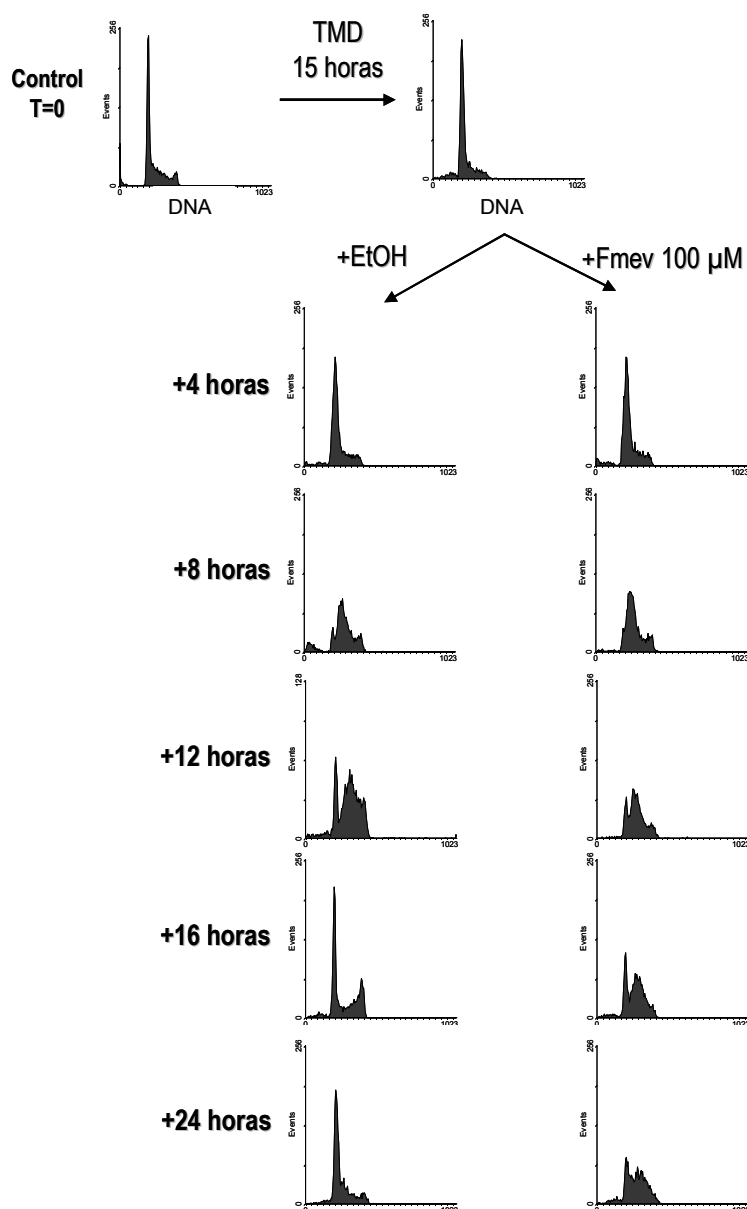


Figura 4. Efecto del fluoromevalonato sobre la liberación de células bloqueadas en G1 por tratamiento con timidina. Las células HL-60 se trataron durante 15 horas con timidina 2 mM. A continuación se retiró la timidina y se resuspendieron en medio fresco en presencia o ausencia (control) de Fmev 100 µM. A los tiempos indicados se tomaron muestras de cada condición y se tiñieron con yoduro de propidio para su análisis por citometría de flujo.

En este momento, a la mitad de las células se les añadió DMSO (disolvente) y a la otra mitad se les añadió nocodazol (**Figura 5**). Este compuesto es un citostático que bloquea las células en mitosis, concretamente en prometafase, al impedir la formación de los microtúbulos e inhibir la formación del complejo ciclina B1/Cdc2 [184]. La adición de nocodazol nos permitió comprobar si las células transitaban a través de la fase S hasta G2/M donde quedarían acumuladas por efecto del nocodazol, una vez que se elimina el Fmev del medio de cultivo. Los resultados muestran que la eliminación del Fmev del medio permitió la progresión de las células hacia G2/M, donde se detuvieron si estaban en presencia de nocodazol, mientras que las incubadas en ausencia de este inhibidor, completaban la mitosis y aparecían en G1. Estos resultados muestran que el efecto producido por el Fmev sobre las células HL-60 es reversible. Observamos, no obstante, que las células necesitan al menos 24 horas para recuperar una progresión del ciclo celular normal lo que estaría indicando que no es el propio compuesto quien detiene el ciclo, como ocurriría con nocodazol, cuya acción se revierte inmediatamente al ser eliminado del medio [185], sino que existe algún efecto secundario fruto del tratamiento con Fmev.

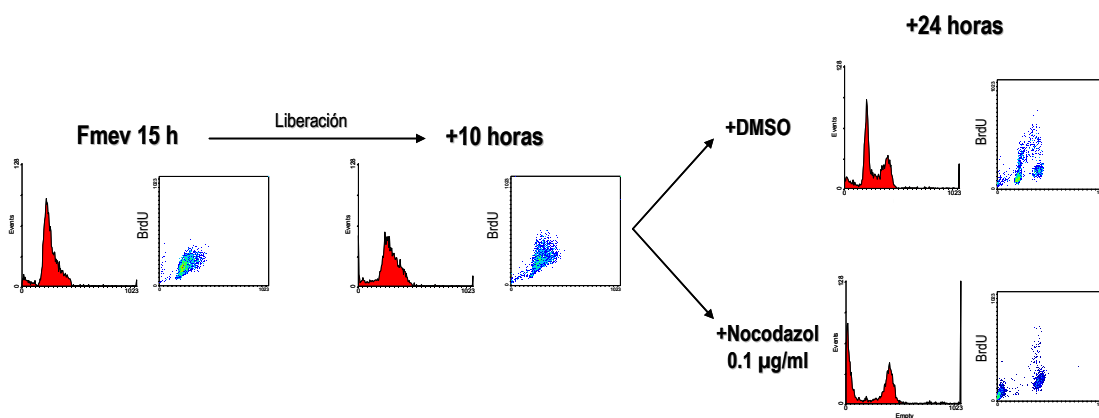


Figura 5. Liberación del efecto del fluoromevalonato sobre el ciclo celular. Las células HL-60 se trataron durante 15 horas con Fmev 100 µM y a continuación se lavaron y se resuspendieron en medio fresco durante otras 10 horas. Transcurrido ese tiempo se añadió a los cultivos nocodazol o su vehículo (DMSO) y se incubaron durante 14 horas más. Durante la última hora se añadió a los cultivos BrdU 100 µM y se procesaron para su análisis por citometría de flujo.

4.3 IMPLICACIÓN DE LAS DIFERENTES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR EN LOS EFECTOS DEL FLUOROMEVALONATO SOBRE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR

Existen varias vías de señalización que están implicadas en el bloqueo del ciclo celular o la apoptosis que se producen en respuesta a diferentes estímulos extracelulares. Estudios previos han demostrado que algunas de estas vías median las interacciones entre el metabolismo del colesterol y el ciclo celular [186-188]. Para tratar de establecer si existe conexión entre el efecto del Fmev y estas vías se emplearon inhibidores específicos de cada una de las rutas.

4.3.1. Papel de la ruta de p38 MAPK. Efecto del inhibidor SB 203580

En nuestro laboratorio habíamos demostrado que esta vía está implicada en el bloqueo en G2/M que se observa por la deficiencia de colesterol producida por el inhibidor SKF 104976 [147]. Bajo estas premisas se estudió el papel que la proteína p38 MAPK pudiera tener en la parada en fase S producida por Fmev.

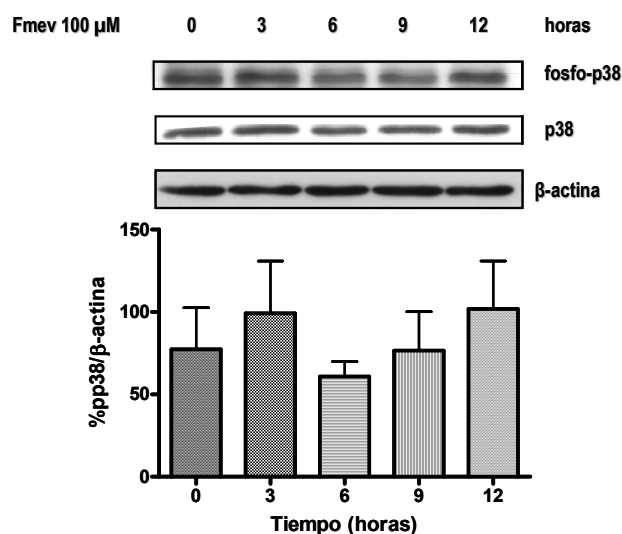


Figura 6. Efecto del fluoromevalonato sobre la expresión y fosforilación de la proteína p38. Las células HL-60 se incubaron en presencia de Fmev 100 μ M durante 3, 6, 9 y 12 horas. Tras comprobar por citometría de flujo la parada en fase S se realizó un western blot con 50 μ g de proteína total utilizando anticuerpos específicos para p38 y P-p38. Las bandas superiores corresponden a un experimento representativo y la gráfica inferior a la media \pm EE de la cuantificación de la densidad óptica de las bandas de P-p38 de un total de 3 experimentos. Los efectos de los distintos tratamientos se analizaron por test de ANOVA sin que se obtuvieran diferencias significativas en ningún caso respecto al control.

En primer lugar se analizó mediante *western blot* la expresión de la proteína en presencia de Fmev a distintos tiempos de tratamiento, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de tratamiento (**Figura 6**). A continuación se estudió si la inhibición de la proteína con el inhibidor SB 203580 prevenía el efecto de Fmev en el ciclo. Para ello las células se sincronizaron en prometafase con nocodazol y se liberaron durante 1 hora en ausencia de inhibidores para permitir que comenzaran a dividirse y alcanzaran G1. En este punto, unas células se dejaron ciclar libremente hacia la fase S y a otras se les añadió Fmev. Las primeras, después de 3 horas, se subdividieron en tres brazos: unas se mantuvieron en esas condiciones (control), a otras se les añadió SB 203580 y a otras, además, Fmev. La razón de retrasar la adición del inhibidor de p38 MAPK era para evitar sus posibles efectos en G1.

A distintos tiempos se analizó la distribución del ciclo celular. Los resultados muestran como en las condiciones en las que hay Fmev, tras 24 horas, las células están paradas en fase S (**Figura 7**). El inhibidor SB 203580 por sí solo produce una aceleración de la salida de G1, como ya se ha descrito previamente [189], sin embargo no produce ningún efecto sobre la parada en fase S provocada por Fmev. Podemos concluir por tanto que la proteína p38 MAPK no tiene un papel fundamental en los efectos del Fmev sobre la progresión del ciclo celular de las HL-60.

4.3.2. Papel de la ruta de JNK/SAPK. Efecto del inhibidor SP 600125

La JNK es una proteína de estrés que participa tanto en el bloqueo del ciclo celular como en su progresión [125]. De las 3 isoformas que se han descrito para JNK, la isoforma 2 (JNK2) es necesaria para la citocinesis [124]. Nosotros decidimos comprobar si JNK participaba en la parada en fase S producida por Fmev. De nuevo, primeramente se llevó a cabo un análisis por *western blot* de la expresión de la proteína en presencia de Fmev a tiempos cortos de tratamiento. Los resultados mostraron que no había diferencias significativas en la expresión de la forma activa (fosforilada) de la proteína por lo que no parecía que esta estuviera implicada en el efecto observado (**Figura 8**). Para confirmar este dato se determinó el efecto de SP 600125, un inhibidor de JNK, sobre la progresión del ciclo celular en las células tratadas con Fmev.

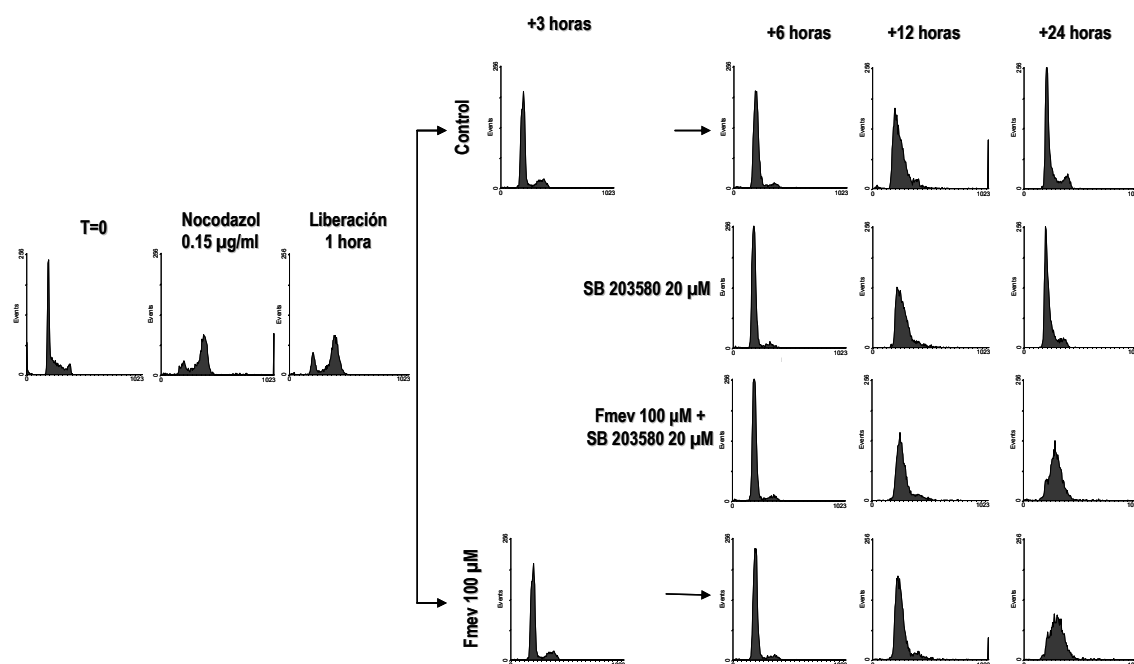


Figura 7. Estudio de la implicación de p38 en la parada en fase S producida por el tratamiento con fluoromevalonato. Las células HL-60 se incubaron en presencia de nocodazol 0,15 µg/ml durante 12 horas, tiempo tras el cual se eliminó del medio y se dejaron ciclar libremente durante 1 hora mas. En este punto, unas células se dejaron ciclar libremente hacia la fase S y a otras se les añadió Fmev. Las primeras, después de 3 horas, se subdivieron en tres brazos: unas se mantuvieron en esas condiciones (control), a otras se les añadió SB 203580 y a otras, además, Fmev. Se tomaron muestras a las 3, 6, 12 y 24 horas. Finalmente se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron en el citómetro de flujo. Los histogramas corresponden a un experimento representativo de 3.

Se procedió del mismo modo que en el apartado anterior para estudiar el papel de p38 MAPK, sincronizando las células en G2/M con nocodazol y liberando 1 y 3 horas antes de la adición de Fmev y SP600125 respectivamente (**Figura 9**). El inhibidor de JNK aisladamente produjo la esperada parada en G2/M, confirmando su actividad. Sin embargo, no alteró la parada en S producida por Fmev. Por lo tanto, la vía de señalización de JNK no participa en el efecto de Fmev.

4.3.3. Papel de la ruta de ERK. Efecto del inhibidor PD 98059

Esta vía constituye una de las principales rutas encargadas de recoger señales extracelulares y su activación controla procesos celulares muy dispares, entre ellos la proliferación, razón por la cual se decidió estudiar su posible participación en el efecto de Fmev. Tras analizar la proteína por *western blot* no se observó variación estadísticamente significativa en los niveles de la forma fosforilada en las células tratadas con Fmev (**Figura 10**).

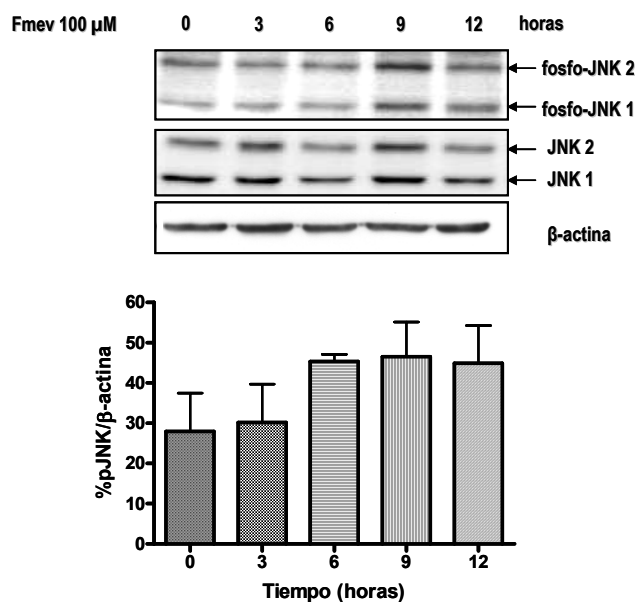


Figura 8. Efecto del fluoromevalonato sobre la expresión y fosforilación de la proteína JNK. Las células HL-60 se incubaron en presencia de Fmev 100 μ M durante 3, 6, 9 y 12 horas. Tras comprobar por citometría de flujo la parada en fase S se realizó un western blot con 50 μ g de proteína total utilizando anticuerpos específicos para JNK y fosfo-JNK (P-JNK). Las bandas superiores corresponden a un experimento representativo y la gráfica inferior a la media \pm EE de la cuantificación de la densidad óptica de las bandas de P-JNK de un total de 3 experimentos. Los efectos de los distintos tratamientos se analizaron por test de ANOVA sin que se obtuvieran diferencias significativas en ningún caso respecto al control.

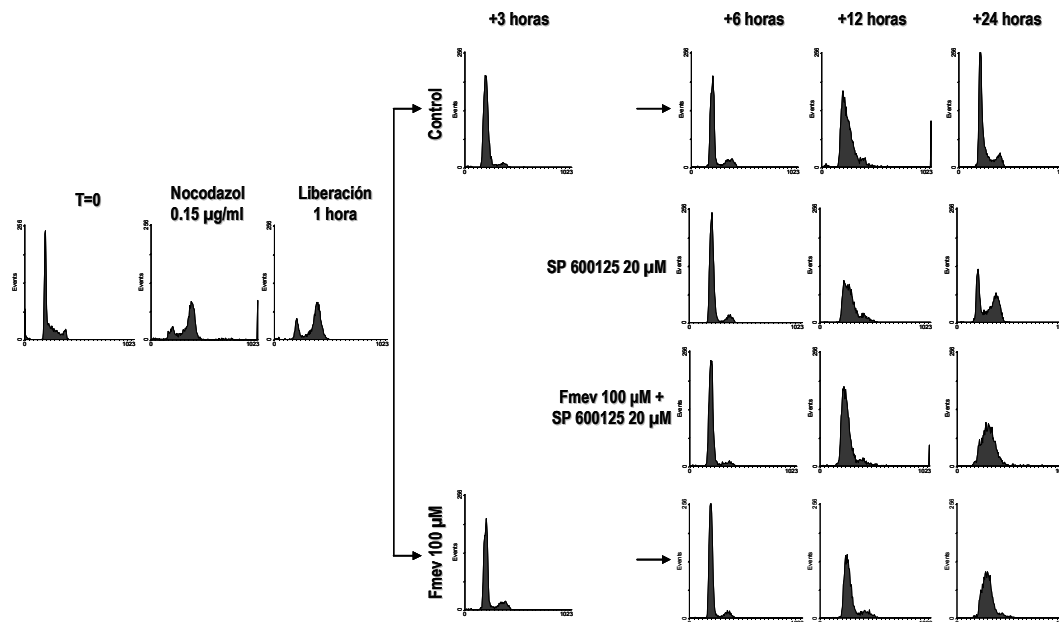


Figura 9. Estudio de la implicación de JNK en la parada en fase S producida por el tratamiento con fluoromevalonato. Las células HL-60 se incubaron en presencia de nocodazol 0,15 μ g/ml durante 12 horas, tiempo tras el cual se eliminó del medio y se dejaron ciclar libremente durante 1 hora mas. En este punto, unas células se dejaron ciclar libremente hacia la fase S y a otras se les añadió Fmev. Las primeras, después de 3 horas, se subdivieron en tres brazos: unas se mantuvieron en esas condiciones (control), a otras se les añadió SP 600125 y a otras, además, Fmev. Se tomaron muestras a las 3, 6, 12 y 24 horas. Finalmente se tiñieron con yoduro de propidio y se analizaron en el citómetro de flujo. Los histogramas corresponden a un experimento representativo de 3.

A continuación se estudió el efecto de su inhibición empleando el compuesto PD 98059. En este caso hubo que cambiar el diseño del experimento debido a que en las células proliferantes, ERK se activa en mitosis pero actúa sobre el tránsito de G1 a S [117]. De este modo, si se mantenía el mismo diseño que el empleado para estudiar la participación de p38 MAPK o JNK las células se bloquearían en G1 al estar inhibida ERK y no se podría apreciar el efecto sobre las células tratadas con Fmev. Para evitar este problema las células, una vez sincronizadas en prometafase con nocodazol, se dejaron ciclar libremente durante una hora y entonces se añadió Fmev 100 μ M o su vehículo, etanol (condición control). En estas condiciones se incubaron durante otras 12 horas y es en ese momento cuando se añadió PD 98059 en combinación o no con Fmev. Se incubaron así durante 12 horas mas (un total de 24 desde la liberación del efecto del nocodazol). Como se puede comprobar la inhibición de ERK por si sola no impidió a las células progresar a G2/M ni tampoco permitió que las células tratadas con Fmev alcanzaran dicha fase, permaneciendo estas bloqueadas en fase S por efecto del Fmev (**Figura 11**).

Todos estos resultados indican que el efecto de Fmev es claramente diferenciable de los que ejercen los inhibidores de las vías de las MAPK y que su acción en S no parece estar mediada por ninguna de esas MAPK tampoco.

4.4 ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE DAÑO EN EL ADN EN LAS CÉLULAS TRATADAS CON FLUOROMEVALONATO

4.4.1. Análisis de la presencia de la proteína γ -H2AX como marcador de daño en el ADN.

Una de las causas de retraso en el avance de la fase S es el daño en el ADN. Dado que la fase del ciclo afectada por el Fmev es la de síntesis de ADN, se estudió el estado de esta molécula en las células tratadas con dicho inhibidor. Para ello se llevaron a cabo sendos análisis por citometría de flujo y por inmunocitoquímica de la aparición de la proteína γ -H2AX descrita como marcador de la presencia de dobles roturas (DSBs) en el ADN.

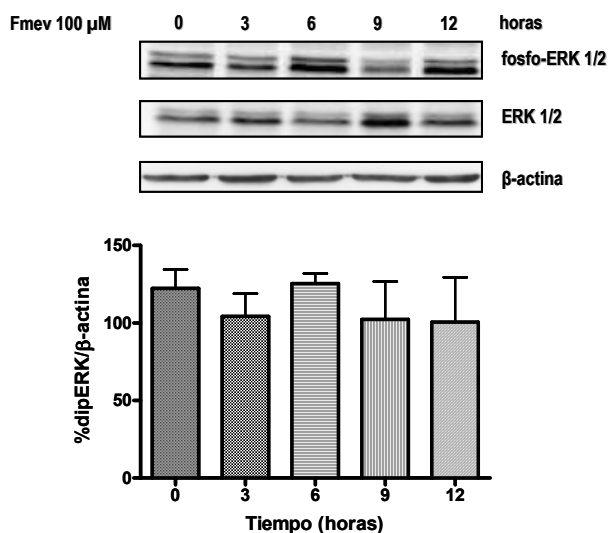


Figura 10. Efecto del fluoromevalonato sobre la expresión y fosforilación de la proteína ERK1/2. Las células HL-60 se incubaron en presencia de Fmev 100 μ M durante 3, 6, 9 y 12 horas. Tras comprobar por citometría de flujo la parada en fase S se realizó un western blot con 50 μ g de proteína total utilizando anticuerpos específicos para ERK 1/2 y fosfo-ERK 1/2 (P-ERK 1/2). Las bandas superiores corresponden a un experimento representativo y la gráfica inferior a la media \pm EE de la cuantificación de la densidad óptica de las bandas de P-ERK 1/2 de un total de 3 experimentos. Los efectos de los distintos tratamientos se analizaron por test de ANOVA sin que se obtuvieran diferencias significativas en ningún caso respecto al control.

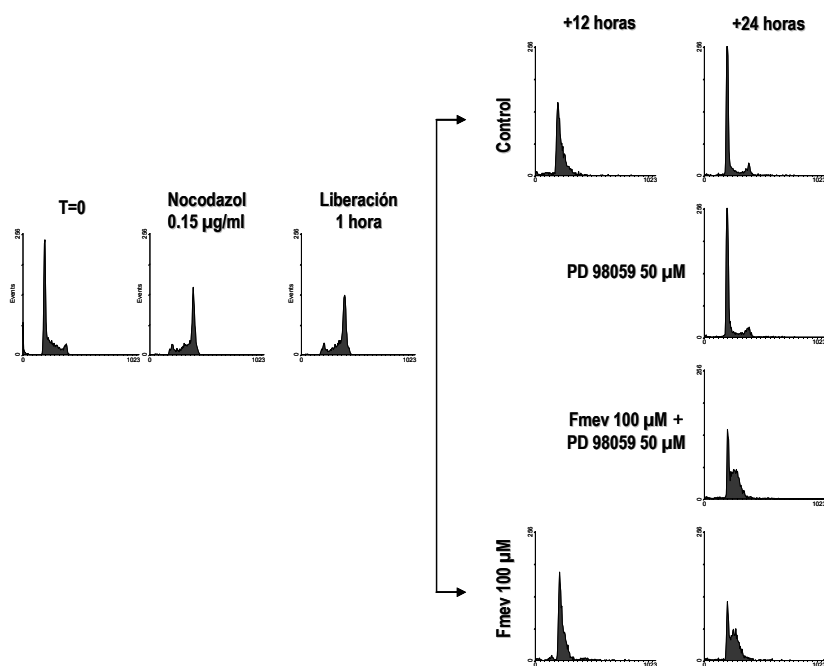


Figura 11. Estudio de la implicación de ERK 1/2 en la parada en fase S producida por el tratamiento con Fmev. Las células HL-60 se incubaron en presencia de nocodazol 0,15 μ g/ml durante 12 horas, tiempo tras el cual se eliminó del medio y se dejaron ciclar en presencia o ausencia (control) del inhibidor de ERK 1/2, PD 98059, durante 1 hora mas. A continuación se añadió a los cultivos Fmev 100 μ M, en combinación o no con PD 98059, y se tomaron muestras a las 3,6,12 y 24 horas. Finalmente se tiñieron con yoduro de propidio y se analizaron en el citómetro de flujo. Los histogramas corresponden a un experimento representativo de 3.

En este caso las células HL-60 y MOLT4 se trataron con Fmev 100 μ M durante 24 horas y se procesaron para inmunocitoquímica como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos, empleando un anticuerpo específico para fosfo- γ H2AX. En la **Figura 12** se puede apreciar como el tratamiento con Fmev produce un incremento de los focos de γ H2AX en ambas líneas celulares y además da lugar a cambios en la morfología de los núcleos, más grandes y menos redondeados en presencia del inhibidor. Para completar el estudio se llevó a cabo un análisis por citometría de flujo realizando un doble marcaje de la proteína y el ADN con yoduro de propidio. Así se pudo comprobar que las células que mostraban un aumento del marcaje de la proteína (en torno a un 60% en células tratadas frente al 4% de las células control) eran fundamentalmente aquellas que se encontraban en la fase S del ciclo celular **Figura 12**, más concretamente al inicio de la misma. Estos datos sugieren que las células comienzan a sintetizar el ADN pero, por efecto del tratamiento con Fmev, acumulan dobles roturas lo que provoca un retraso a través de la fase S y que no alcancen G2/M.

Para determinar si este efecto era extensivo a otros inhibidores de la MVD tratamos las células HL-60 con fenialcetato (PA) descrito como inhibidor de la enzima [21] durante 24 horas y analizamos tanto la distribución del ciclo celular, como la síntesis de ADN y el incremento de γ -H2AX. Comprobamos que, igual que ocurriera con Fmev, el tratamiento con PA producía una acumulación de las células en la fase S del ciclo celular, con bloqueo de la incorporación de BrdU al ADN e incremento de la población de células positivas para γ -H2AX (**Figura 13**).

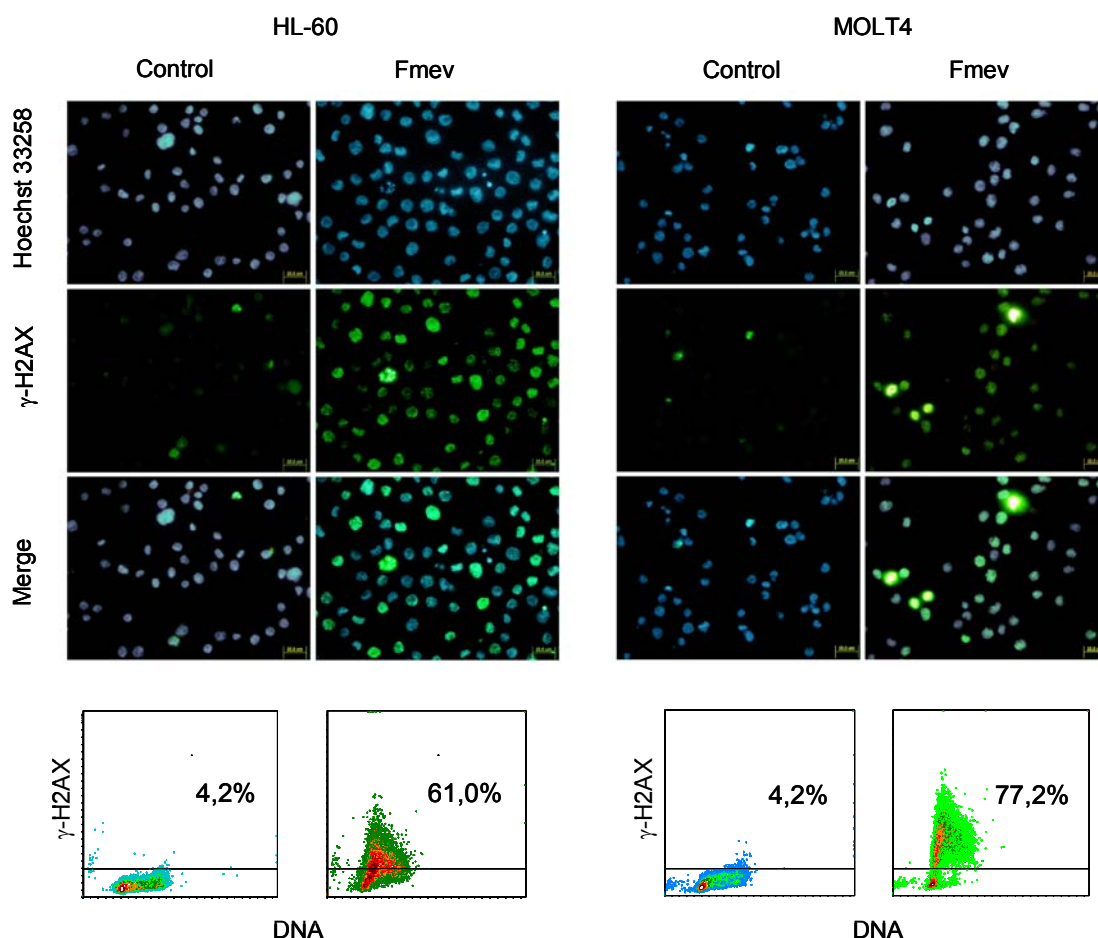


Figura 12. Estudio de la presencia de dobles roturas en el ADN (DSBs) por efecto del tratamiento con fluoromevalonato. Las células HL-60 y Molt4 se incubaron en placas multipocillo en presencia o ausencia (control) de Fmev 100 μ M durante 24 horas. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo para γ -H2AX y un secundario marcado con FITC (verde) y los núcleos se tiñieron con Hoescht 33258 (A). Para el análisis por citometría de flujo se llevó a cabo un doble marcaje de la proteína y el ADN, empleando yoduro de propidio (B).

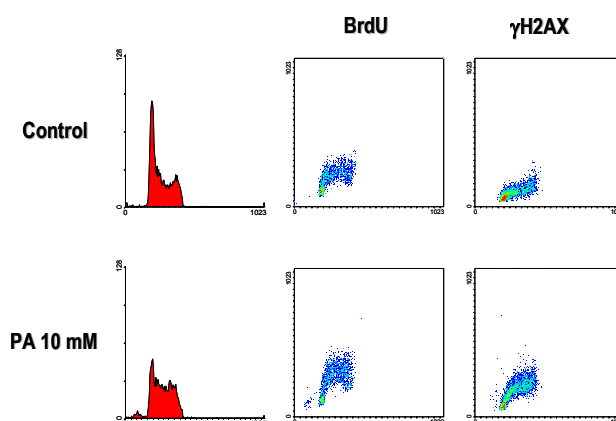


Figura 13. Efecto del tratamiento con fenilacetato (PA). Las HL-60 se incubaron en presencia o ausencia (control) de PA 10 mM. Una hora antes de la toma de cada muestra se añadió BrdU 100 μ M al medio de cultivo. A continuación las muestras se marcaron para el análisis de la incorporación de BrdU o se marcaron para el estudio de la proteína γ -H2AX. En todos los casos se llevó a cabo un doble marcaje con yoduro de propidio y se analizaron las células en el citómetro de flujo.

4.4.2. Análisis del papel de fluoromevalonato sobre la producción de ROS.

Efecto de la adición de diferentes compuestos antioxidantes

Una de las causas que conduce a la formación de dobles roturas en el ADN es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [190]. Para evaluar la generación de ROS en las células, se determinó la formación de diclorofluoresceína (DCF) a partir de diclorofluoresceína diacetato reducida (DCFH₂-DA). Esta molécula presenta la peculiaridad de que primeramente debe ser hidrolizada por esterasas intracelulares y posteriormente es oxidada por los ROS (particularmente, el anión superóxido), dando lugar a DFC, que es fluorescente. Para ello, las células HL-60 se trataron con Fmev 100 μ M durante 24 horas y a continuación se incubaron durante 30 minutos a 37°C en presencia de DCFH₂-DA. Las muestras se analizaron para determinar la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo.

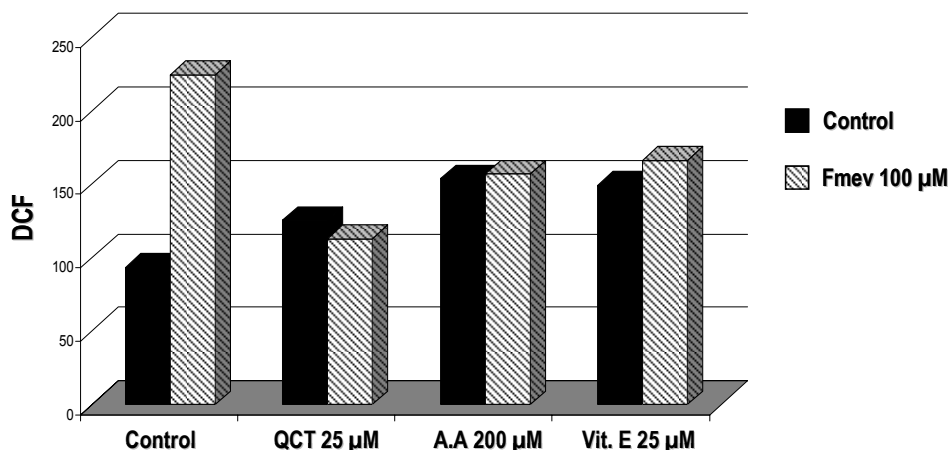


Figura 14. Estudio de la presencia de ROS por efecto del tratamiento con fluoromevalonato y de la adición de distintos antioxidantes. Las células HL-60 se incubaron en presencia o ausencia (control) de Fmev 100 μ M en combinación o no con distintos antioxidantes durante 24 horas. A continuación se incubaron con DCFH₂-DA durante 30 minutos a 37 °C y se analizaron en el citómetro de flujo. Los datos de la gráfica corresponden a las medianas geométricas de los datos de DCF (forma oxidada) de un experimento representativo.

Como se puede observar en la **Figura 14**, el tratamiento con Fmev produce un incremento de la fluorescencia de DCF respecto a las células control.

A la vista de estos resultados se planteó que determinados agentes antioxidantes podrían prevenir el efecto de Fmev al evitar la acumulación de ROS. Con esta finalidad se emplearon diferentes antioxidantes (quercetina, ácido ascórbico y vitamina E) a dosis suficientemente altas. Los datos de citometría

muestran que el incremento de DCF producto del tratamiento con Fmev se reduce en presencia de cualquiera de los antioxidantes.

El siguiente paso fue determinar si, además de reducir la presencia de ROS, los antioxidantes prevenían el efecto del Fmev sobre el ciclo celular. Para ello las células HL-60 se incubaron en presencia de Fmev y/o los diferentes antioxidantes y se estudió el ciclo celular y la presencia de γ -H2AX por citometría de flujo. Como puede observarse en la **Figura 15**, ninguno de los antioxidantes evitó el bloqueo en fase S provocado por Fmev y tampoco fueron capaces de anular el daño en el ADN, como lo demuestra el incremento de γ -H2AX en las células tratadas con Fmev independientemente de la presencia o ausencia de antioxidantes.

Los resultados indican que si bien el tratamiento con Fmev induce la formación de radicales libres, que pueden ser contrarrestados por antioxidantes, estos agentes no son los causantes de las dobles roturas generadas por aquel inhibidor de la biosíntesis de colesterol.

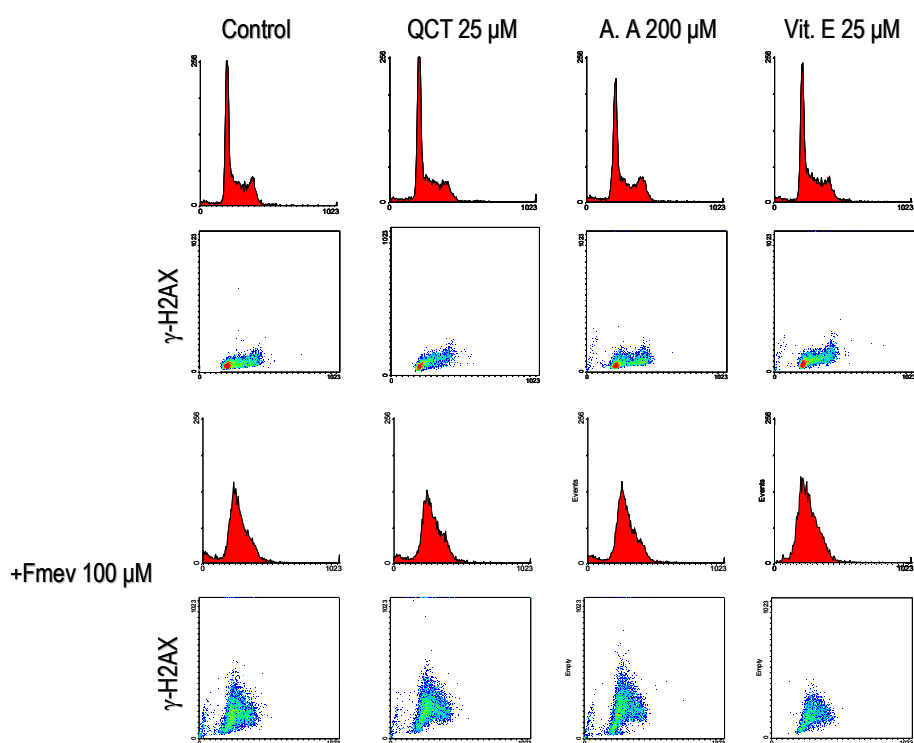


Figura 15. Prevención del efecto de fluoromevalonato sobre la distribución del ciclo celular y la presencia de daño en el ADN por el tratamiento con antioxidantes. Las células HL-60 se incubaron en presencia o ausencia (control) de Fmev 100 μ M en combinación o no con diferentes antioxidantes durante 24 horas. A continuación se llevó a cabo un doble marcaje para la proteína γ -H2AX y el ADN por tinción con yoduro de propidio y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo. Los datos corresponden a un experimento representativo de 3.

4.4.3. Implicación de las vías de respuesta al daño en el ADN

4.4.3.1. Papel de las proteínas sensoras ATR/ATM

Como se ha descrito anteriormente, el tratamiento de las células con Fmev produce su acumulación en la fase S del ciclo celular. Se conoce la implicación de la señalización de las proteínas ATM y ATR en la parada del ciclo en esta fase, por lo que en los siguientes experimentos se exploró el efecto del tratamiento con Fmev sobre la activación de dichas proteínas. Para ello las células HL-60 se incubaron en presencia de Fmev 100 μ M y se estudió la expresión de las quinasas ATM y ATR, analizando las formas fosforiladas. Como muestran los resultados de la **Figura 16**, para la proteína fosfo-ATR se observa ya un aumento a las 3 horas de tratamiento, que aumenta posteriormente. La activación de ATM es más tardía observándose la elevación a las 6 horas de tratamiento.

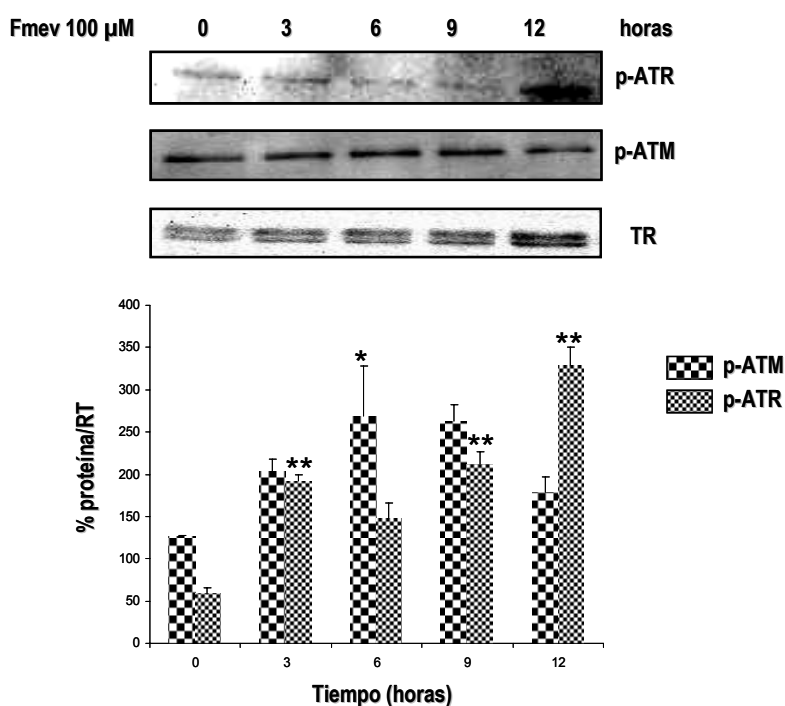


Figura 16. Estudio de la activación de las proteínas sensoras del daño en el ADN. Las células HL-60 se incubaron en presencia de Fmev 100 μ M durante un total de 12 horas. A los tiempos indicados se tomaron muestras para el análisis de la expresión de proteína por western blot. Para ello se emplearon anticuerpos específicos de fosfo-ATM y fosfo-ATR y se empleó el receptor de transferrina (TR) como control de carga. Las imágenes superiores corresponden a un experimento representativo. En la gráfica inferior se representan las medias \pm EE de la densidad óptica de las bandas de fosfo-ATM y fosfo-ATR como el porcentaje de expresión respecto a TR. Los efectos del tiempo de tratamiento sobre cada proteína se analizaron por ANOVA que fue significativa. Posteriormente se analizó por el test de Tukey para comparaciones múltiples. Los asteriscos indican aquellos tiempos para los que el incremento de la forma fosforilada de cada proteína es estadísticamente significativo respecto al control (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$).

Se ha descrito que ATM y ATR son las proteínas encargadas de fosforilar H2AX cuando se produce daño en el ADN. Para confirmar su implicación en la acción del Fmev se analizó el efecto de la inhibición de estas dos enzimas sobre la formación de los focos de γ -H2AX. Para ello se emplearon los compuestos NU6027 y KU55933, inhibidores de ATR y ATM respectivamente. Las células HL-60 se incubaron en presencia de Fmev 100 μ M durante 3 horas y a continuación se añadió NU6027 25 μ M o KU55933 10 μ M a los cultivos. Se analizó la distribución del ciclo celular y la presencia de γ -H2AX a las 24 horas por citometría de flujo. Los resultados mostraron que la inhibición de ATR, pero no la de ATM, reducía intensamente la formación de γ -H2AX. Este descenso se detectó especialmente en las células en fase S. No obstante, las células no progresaron hasta G2/M, más bien parecía que una parte de las células estaban detenidas en G1 y otras entraban en apoptosis como indica el incremento de subG1 (Figura 17).

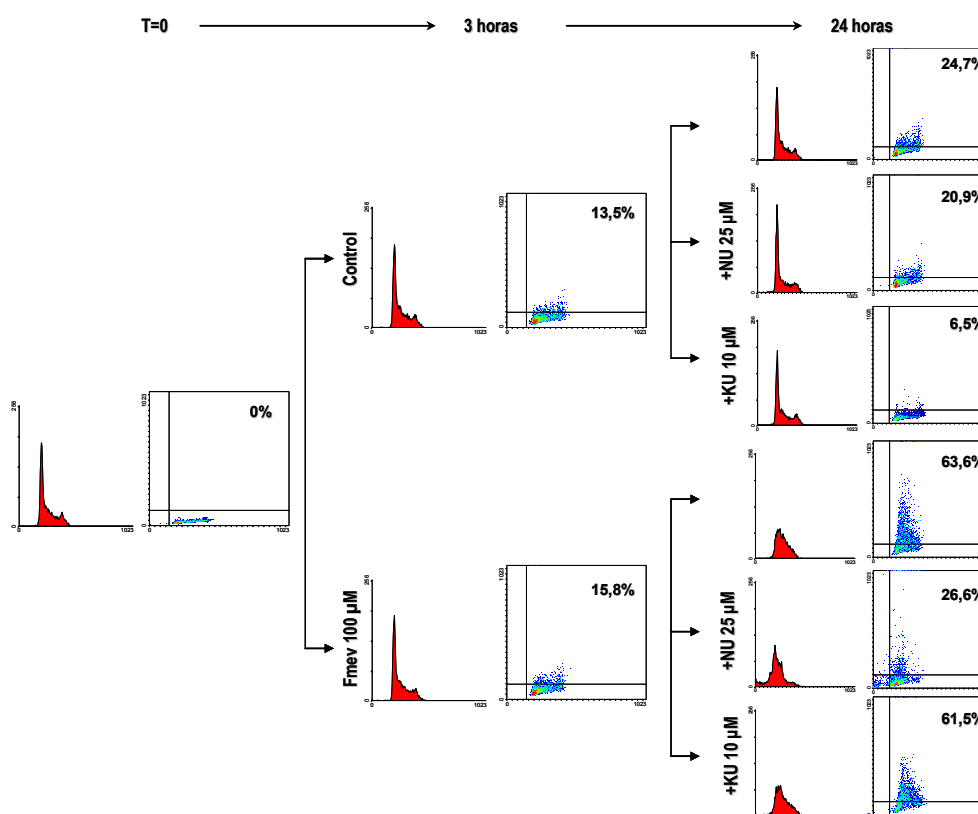


Figura 17. Estudio del efecto de la inhibición de ATM y ATR sobre la distribución del ciclo celular y la presencia de daño en el ADN. Las células HL-60 se preincubaron en presencia o ausencia (control) de Fmev 100 μ M durante 3 horas. A continuación se añadió a los cultivos el inhibidor de ATR - NU 6027 25 μ M - o el de ATM- KU 55933 10 μ M- en combinación o no con Fmev durante 21 horas más. A los tiempos indicados se tomaron muestras para el doble marcaje para la proteína γ H2AX y el ADN por tinción con yoduro de propidio y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo. Los datos corresponden a un experimento representativo de 3. En cada gráfico se muestra el porcentaje de células positivas para la proteína γ H2AX.

4.4.3.2. Papel de las proteínas efectoras Chk1 y Chk2

Las proteínas Chk1 y Chk2 son las encargadas de transmitir la señal de daño en el ADN detectado por las proteínas ATR y ATM al resto de la célula. Para determinar el papel de estas proteínas en los efectos del Fmev, las células HL-60 se incubaron en presencia de Fmev 100 μ M y se estudió, en primer lugar, la expresión de fosfo-Chk1, fosforilada en dos residuos diferentes S317 y S345, y de fosfo-Chk2 (T68) por western blot a diferentes tiempos de tratamiento durante un total de 12 horas. En cuanto a Chk1, los resultados mostraron un incremento de la presencia de la forma activa, fosforilada en ambos residuos, que es estadísticamente significativo a las 9 horas (**Figura 18.A**). También se observó un incremento de la forma fosforilada de Chk2, pero más tardío ya que se produce a las 12 horas (**Figura 18.B**).

Los resultados parecen indicar que por efecto del tratamiento con Fmev las células HL-60 activan principalmente la vía de ATR-Chk1 y posteriormente la de ATM-Chk2.

4.4.3.2.1. Efecto de la activación de Chk1 sobre la proteínas Cdc25A fosfatasa

La fosfatasa Cdc25A está implicada en la progresión a través de la fase S. Cuando se produce un estrés replicativo, la proteína Chk1 se encarga de fosforilar a Cdc25A promoviendo su degradación [191]. Basándonos en esos datos, decidimos analizar los niveles de Cdc25A en células sincronizadas en fase S, tratadas o no con Fmev. Para ello las células HL-60 se trataron primeramente con nocodazol 0,15 μ g/ml durante 12 horas para sincronizarlas en G2/M. Posteriormente se retiró el nocodazol del medio y las células se dejaron ciclar en medio fresco una hora más para permitir que completaran la mitosis. A continuación se incubaron 10 horas más para que entraran en S, en ausencia (control) o en presencia de Fmev 100 μ M, y se analizó la presencia de Cdc25A por western blot. Los resultados se muestran en la **Figura 19**. Los histogramas revelan que en ambas condiciones la mayor parte de las células se encontraban en fase S. Sin embargo, las células tratadas con Fmev presentaban un claro descenso en el contenido de Cdc25A con respecto a la condición control. Estos resultados sugieren que el retraso en el avance a través de la fase S promovido por la

inhibición de MVD está mediado por la inhibición de Cdc25A probablemente inducida por Chk1.

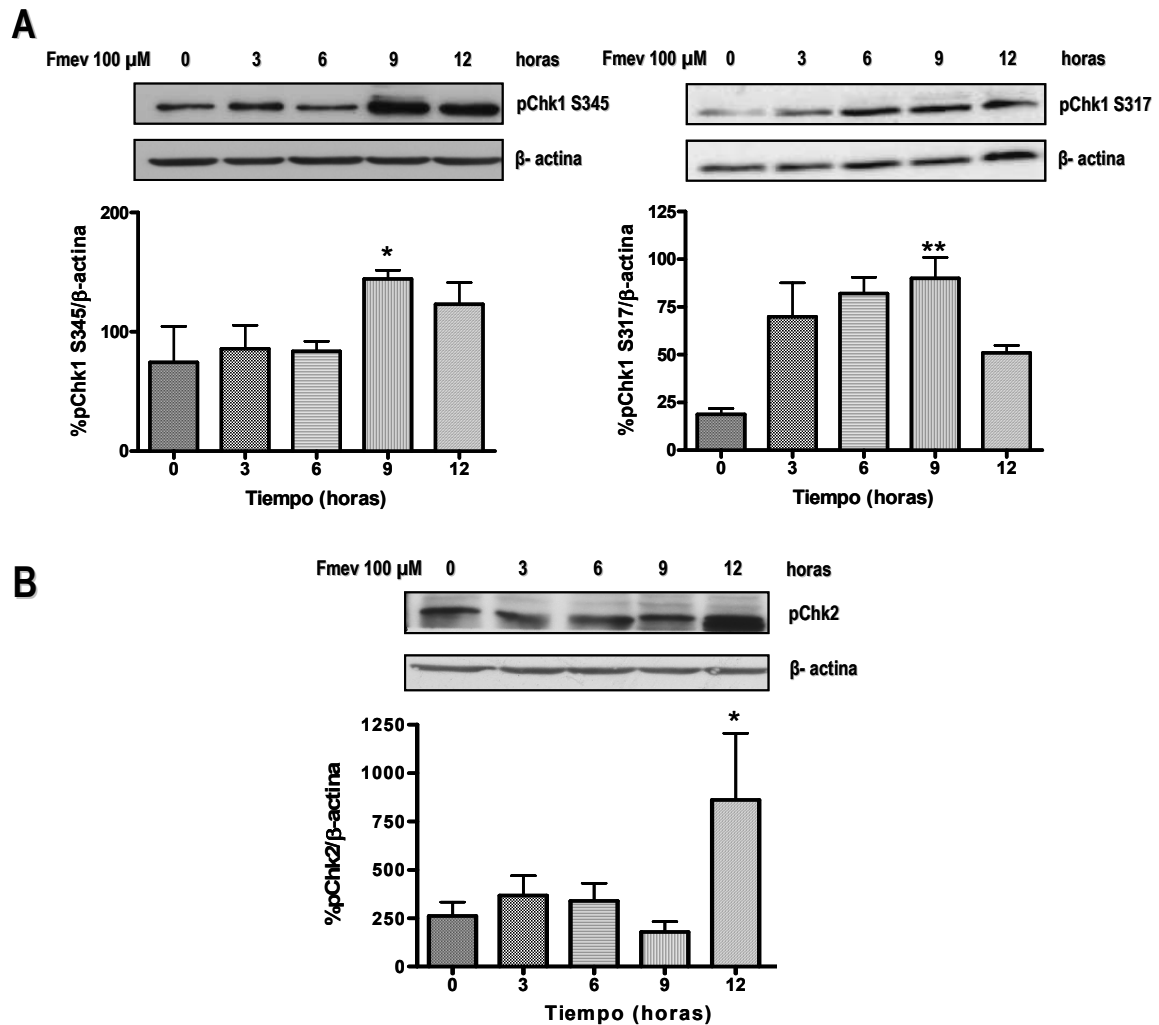


Figura 18. Efecto del Fmev sobre la activación (fosforilación) de las proteínas Chk. Las células HL-60 se trataron con Fmev 100 μ M. A los tiempos indicados se tomaron muestras y se analizaron por citometría de flujo para comprobar la parada en fase S. A continuación se analizaron las muestras por western blot con 50 μ g de proteína total utilizando anticuerpos específicos para **A.** pChk1 S345 y pChk1 S317 y **B.** pChk2 Thr68. Las imágenes superiores corresponden a un experimento representativo y la gráfica inferior a la media \pm EE de la cuantificación de la densidad óptica de las bandas de cada proteína de un total de 3 experimentos. Los efectos de los distintos tratamientos se analizaron por test de ANOVA que fue significativo para las 3 proteínas estudiadas. Se analizaron entonces por el test de Tukey para comparaciones múltiples. Los asteriscos indican los tiempos en los que la forma fosforilada de la proteína se incrementa de forma estadísticamente significativa respecto al control (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$)

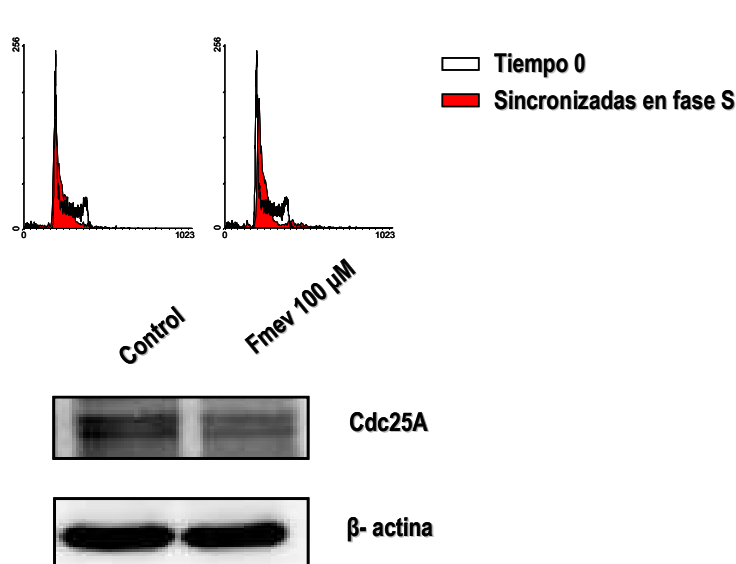


Figura 19. Efecto del fluoromevalonato sobre la proteína fosfatasa Cdc25A. Las células HL-60 se sincronizaron en prometafase por tratamiento con nocodazol durante 2 horas. A continuación se eliminó el compuesto del medio de cultivo y se resuspendieron en medio fresco conteniendo disolvente (control) o Fmev 100 μ M. Transcurridas 11 horas se tomó muestra para la tinción del ADN con yoduro de propidio. Una vez confirmado que las células se encontraban sincronizadas al

inicio de S se analizaron las muestras por western blot con 50 μ g de proteína total utilizando anticuerpos específicos para la proteína Cdc25A fosfatasa. Las imágenes superiores corresponden a un experimento representativo. La línea representa la distribución del ciclo en condiciones control y el histograma en color rojo la distribución del ciclo celular tras el tratamiento indicado. Se empleó β -actina como proteína de control de carga.

4.4.3.3. Efecto de la inhibición de la vía de ATR-Chk1

4.4.3.3.1. Efecto del inhibidor UCN01

Dado que UCN01 se ha descrito como un potente inhibidor de Chk1 [192], se trató de comprobar si el tratamiento de las células HL-60 con este compuesto prevenía la parada del ciclo celular inducida por Fmev y permitía a las células alcanzar la fase G2/M. Este compuesto presenta una toxicidad elevada, lo que impide prolongar demasiado el tiempo de tratamiento. En primer lugar se llevó a cabo un análisis del número de células que expresaban fosfo-H3 (marcador de mitosis) tras el tratamiento con Fmev, comprobándose su disminución a lo largo del tratamiento (8 y 24 horas). A tiempos cortos las células positivas para la histona eran aproximadamente un 1% del total, mientras que a tiempos más largos dicho porcentaje descendía hasta el 0,2%. Estos datos confirman una parada en fase S por efecto del Fmev, sin afectación directa de la mitosis. Conocidos estos datos se seleccionó el tiempo de 8 horas de tratamiento con Fmev para comprobar el efecto de la inhibición de Chk1 con UCN01. Para ello las células se pre-incubaron en presencia de Fmev 100 μ M durante 8 horas (tiempo suficiente para que el compuesto ejerciera su efecto) y a continuación se añadió a los cultivos UCN01 1 μ M durante 1, 2 y 3 horas mas. En estas condiciones se estudió por citometría de

flujo la expresión de fosfo-H3 en un análisis combinado con el marcaje del ADN por yoduro de propidio. En la **Figura 20**, que corresponde a un experimento representativo, se observa como en las células incubadas en condiciones control, un 1,9% muestran marcaje positivo para fosfo-H3 (mitosis). Cuando las células se trataron con Fmev, prácticamente se suprimió la señal de fosfo-H3 (0,50%), en línea con la esperada desaparición de células en mitosis provocada por el bloqueo en fase S. El UCN01 por sí solo apenas afectó la presencia de células en mitosis respecto a la condición control, pero cuando se combinó con Fmev se incrementó el porcentaje de células marcadas para fosfo-H3 (1,32%) con respecto a éste, indicando que una determinada proporción de las células detenidas en S por efecto de Fmev progresaron hasta G2/M (**Figura 20**).

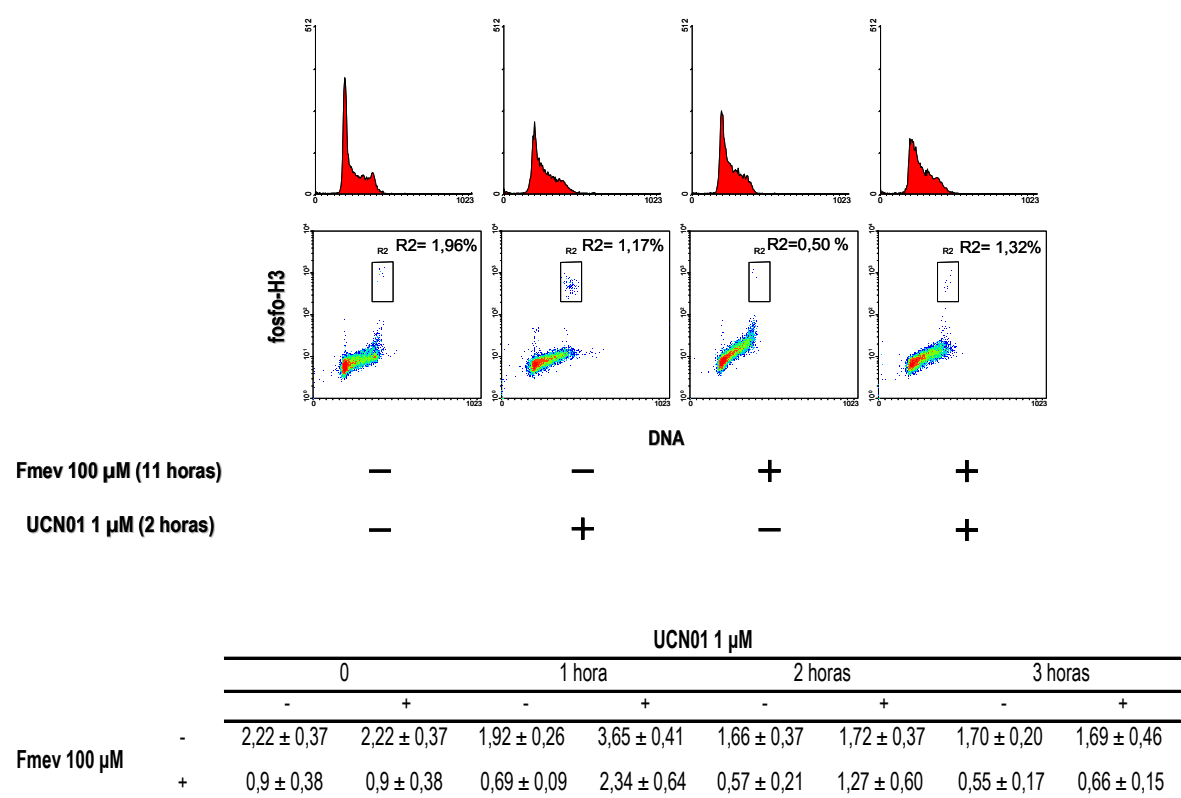


Figura 20. Efecto de la inhibición de la proteína Chk1 sobre las células tratadas con fluoromevalonato. Las células HL-60 se trataron en presencia o ausencia de Fmev 100 μM durante 8 horas. Trascurrido ese tiempo se añadió a los cultivos UCN01 1 μM en combinación o no con Fmev. A continuación se llevó a cabo un doble marcaje para la detección del ADN (yoduro de propidio) y la proteína fosfo-H3. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo. En la tabla se muestran los resultados (media ± EE) de 3 experimentos.

4.4.3.3.2. Efecto de la inhibición de la proteína Chk1 con un siRNA

Con el fin de apoyar estos datos y terminar de confirmar la participación de Chk1 en la parada del ciclo celular por Fmev, se llevó a cabo una inhibición constitutiva de la proteína transfectando las células HL-60 con un siRNA específico. Una vez transfectadas, las células fueron incubadas durante 15 h en presencia de Fmev 100 μ M y se tomaron muestras para el estudio de la expresión de la proteína por western blot y el análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Los resultados se muestran en la **Figura 21** y permiten comprobar, en primer lugar, que la transfección con el siRNA específico para la proteína prácticamente anuló su expresión, mientras que el siRNA inespecífico no la afectó (**Figura 21.A**). En cuanto al ciclo celular, el siRNA inespecífico no alteró la respuesta habitual de las células: ciclan normalmente en condiciones control y al incubarlas con Fmev se paran en fase S bloqueándose la síntesis de ADN, como así lo demuestran los datos de incorporación de BrdU. La transfección de las células con el siRNA de la proteína, en un primer momento parecía prevenir el bloqueo en fase S a la vista del perfil del ciclo celular, sin embargo el análisis de incorporación de BrdU mostraba un bloqueo de las células en la fase G1 (**Figura 21.B**). Para analizar las causas de este bloqueo, que no se observa en las células transfectadas con el siRNA inespecífico, analizamos la expresión de p21. Rodríguez y col. [193] describieron que, ante la depleción de Chk1, las células sometidas a estrés por inhibidores de la replicación, activan p21 para evitar una respuesta apoptótica. El papel de p21, según proponen estos autores, sería el de evitar la muerte celular en ausencia de Chk1 a través de la inhibición de quinasas dependientes de ciclina, retrasando la entrada en S, que es donde se induciría la muerte celular. Para confirmar la validez de dicha hipótesis en nuestro caso, analizamos la expresión de la proteína por WB. La **Figura 21.C** muestra que efectivamente se produce un incremento de la expresión de p21 en las células transfectadas con el siRNA de Chk1 que no se observa ni en células no transfectadas ni en las transfectadas con el siRNA inespecífico.

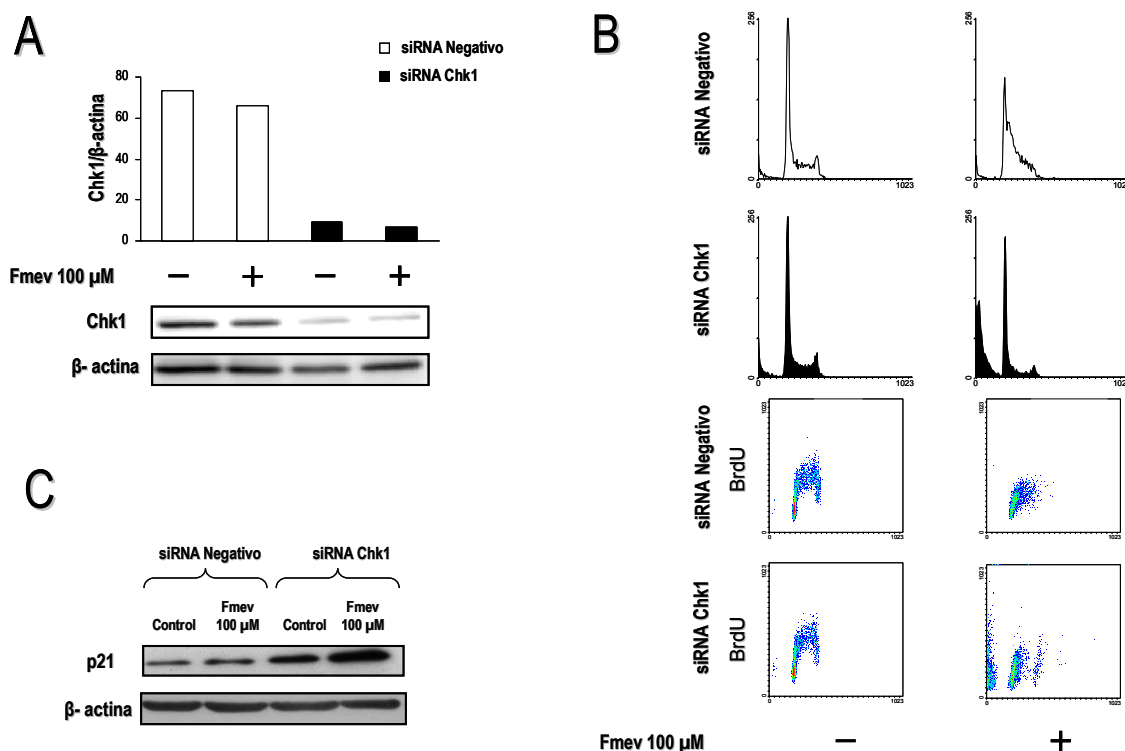


Figura 21. Estudio de los efectos del silenciamiento de la proteína Chk1 con un siRNA. Las células HL-60 se transfectaron mediante electroporación con un siRNA específico para la proteína Chk1 y otro inespecífico como control. (A) Determinación por western blot del silenciamiento de Chk1. Las células transfectadas se trataron en presencia o ausencia de Fmev 100 μM durante 15 horas. Transcurrido ese tiempo se lisaron y se analizaron 50 μg de proteína total utilizando un anticuerpo específico para Chk1 y β-actina como control de carga. (B) Estudio del efecto del silenciamiento de Chk1 sobre las células tratadas con Fmev. Las células transfectadas se trataron en presencia/ausencia de Fmev 100 μM durante 15 horas. Una hora antes de tomar las muestras se añadió a los cultivos BrdU 100 μM. Las células se procesaron para su análisis en el citómetro de flujo. (c) Estudio de la expresión de la proteína p21 por western blot en células transfectadas con un siRNA para Chk1. Las células transfectadas se incubaron en presencia o ausencia (control) de Fmev 100 μM durante 15 horas. A continuación se lisaron y se analizaron 50 μg de proteína total por western blot empleando un anticuerpo específico para p21 y β-actina como control de carga.

Estos datos indican que este modelo experimental (anulación de Chk1 mediante siRNA) no permite determinar el papel de Chk1 en la parada en fase S provocada por Fmev por cuanto las células se detienen en G1, impidiéndose que tenga lugar el efecto de Fmev.

4.4.3.3. Efecto de la inhibición de la vía de ATR-Chk1 sobre células sincronizadas en fase S. Análisis de la expresión de ciclina B1

Hasta aquí hemos mostrado que el tratamiento de las células HL-60 con Fmev activa la vía de ATR-Chk1, lo que presuntamente provocaría un retraso en el

avance a través de la fase S del ciclo celular. Para demostrar la implicación de esta vía en el efecto provocado por Fmev tratamos de inhibirla en las células en fase S, tratadas o no con el inhibidor, para comprobar si progresaban a G2/M. Para ello las células se sincronizaron en prometafase con nocodazol y posteriormente se lavaron y se dejaron ciclar durante 1 hora. A continuación, a unas se les añadió Fmev y a otras no (Control) y se incubaron durante 10 horas más, para permitir que todas ellas estuvieran en la fase S del ciclo. Se añadió entonces a los cultivos UCN01 o NU 6027, inhibidores de Chk1 y ATR respectivamente. A los tiempos indicados se estudió la progresión del ciclo celular por tinción del ADN con yoduro de propidio. Los resultados se muestran en la **Figura 22**. Como se observa, transcurridas 11 horas tras retirar el nocodazol, las células control se encontraban al inicio de la fase S y durante las horas posteriores progresaron normalmente a través de dicha fase hasta alcanzar G2/M. La inhibición de Chk1 con UCN01 en esas células no impidió su progresión a través de esa fase y alcanzar G2/M aunque se incrementó considerablemente la muerte celular respecto a la condición control, a costa de la fase S. La inhibición de ATR con NU 6027 tampoco impidió que las células alcanzaran G2/M, aunque se incrementó la muerte celular.

En cuanto a las células tratadas con Fmev, se observó que 11 horas después de la liberación del efecto de nocodazol también se encontraban al inicio de S pero a lo largo de las 7 horas posteriores, avanzaron lentamente por S sin llegar a alcanzar G2/M. En este caso, ni la inhibición de Chk1 con UCN01, ni la de ATR con NU 6027 permitieron la progresión a G2/M.

Los últimos resultados parecían mostrar una contradicción con respecto a los comentados en los apartados 4.3.1 y 4.3.3.1, que fueron obtenidos con células no sincronizadas. Así, el tratamiento con NU 6027 disminuía el marcaje de γ -H2AX en las células tratadas con Fmev, aunque no permitía que las células progresaran a mitosis (**Figura 17**), mientras que el tratamiento con UCN incrementaba, si bien ligeramente, el número de células en mitosis, (**Figura 20**). Resumiendo, en los cultivos asincrónicos, la inhibición de ATR o Chk1 en las células tratadas con Fmev incrementaba el número de células en mitosis, mientras que en las células sincronizadas en S la inhibición de dichas proteínas no parece facilitar la progresión a través de S. Estos resultados sugieren que en los cultivos asincrónicos el tratamiento con Fmev no afecta por igual a todas las células, permaneciendo

algunas donde la inhibición de ATR o de Chk1 les permita alcanzar G2/M, o bien que la acción de ATR o de Chk1 difiera según la fase en la que se encuentre la célula. Trabajos previos de otros autores demuestran que la inhibición de Chk1 en células sometidas a algún tipo de estrés genotóxico induce una condensación prematura de la cromatina acompañada de catástrofe mitótica, lo que se interpreta como una inducción extemporánea de la mitosis [194].

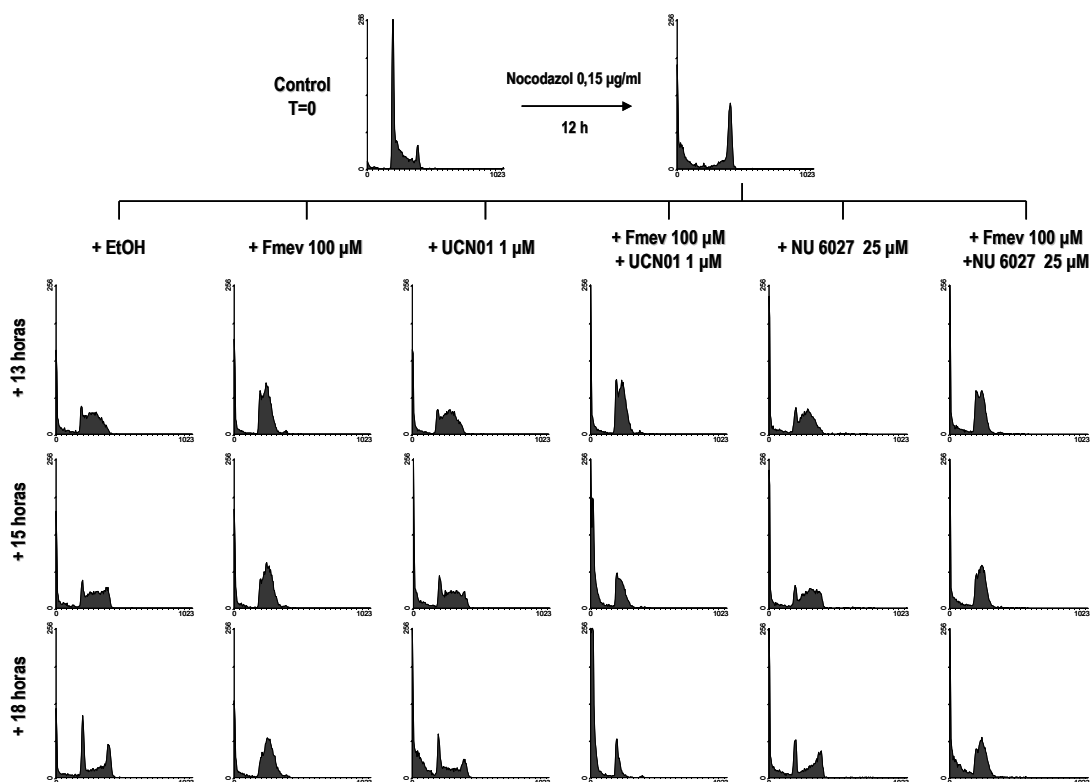


Figura 22. Estudio del efecto de la inhibición de ATR y Chk1 en células sincrónicas pretratadas con fluoromevalonato. Las células HL-60 se sincronizaron en prometafase por tratamiento con nocodazol 0,15 µg/ml durante 12 horas. A continuación se respuso medio fresco. Una hora después se añadió a los cultivos Fmev 100 µM o su vehículo (EtOH). En estas condiciones se incubaron 11 horas más, momento en el que se añadieron a los cultivos UCN01 1 µM o NU 6027 25 µM. A los tiempos indicados se tomaron muestras para el análisis de la distribución del ciclo celular en el citómetro de flujo por tinción con yoduro de propidio.

La entrada en mitosis viene precedida por la expresión de ciclina B1, lo que la convierte en un eficaz biomarcador de la inhibición de Chk1. Así, mediante el estudio de la expresión de ciclina B1 tratamos de comprobar si la inhibición de Chk1 en las células tratadas con Fmev producía estos efectos.

En primer lugar comprobamos como evolucionaba la expresión de ciclina B1 en células controles liberadas del efecto de nocodazol. Como se aprecia en la **Figura**

23, tras 12 horas de tratamiento con nocodazol existe un alto porcentaje de células positivas para ciclina B1. Después de 11 horas de liberación todas las células se encuentran en G1 y al inicio de S por lo que no hay células positivas para la proteína. A medida que van avanzando a través de S y llegando a G2 la presencia de células que expresan ciclina B1 se va incrementando progresivamente hasta encontrarse una población de células en G2/M con un alto contenido de ciclina B1 a las 18 horas.

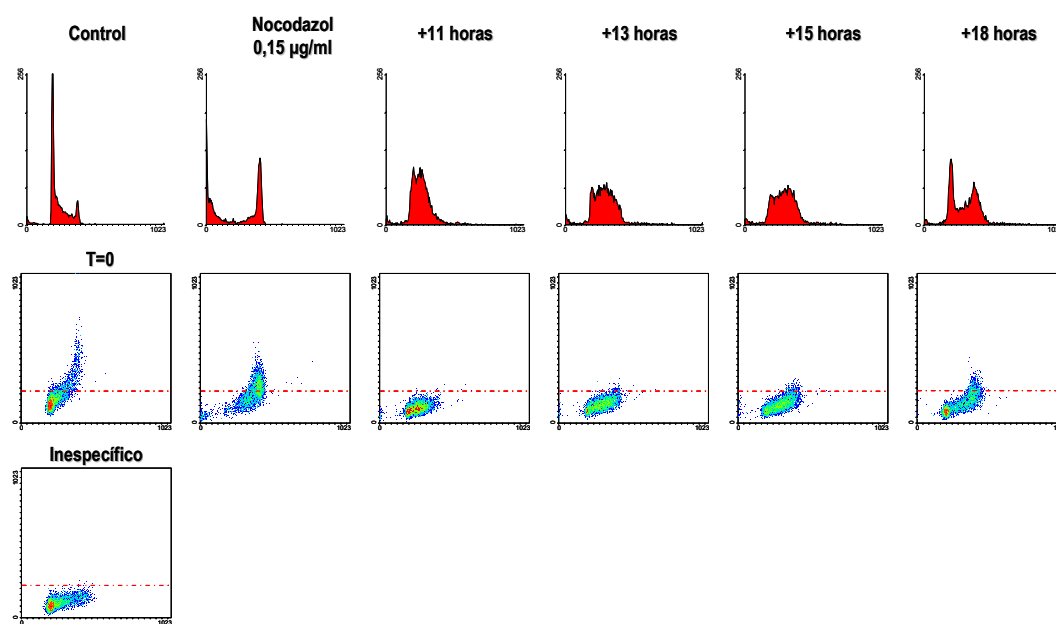


Figura 23. Análisis de la expresión de ciclina B1 en células sincronizadas. Las células HL-60 se sincronizaron en prometafase por tratamiento con nocodazol 0,15 µg/ml durante 12 horas. A continuación las células se resuspendieron en medio fresco y se dejaron ciclar libremente. A los tiempos indicados se tomaron muestras para el análisis de la distribución del ciclo celular y la expresión de ciclina B1 por citometría de flujo. Los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de 5.

A la vista de estos resultados estudiamos el efecto del tratamiento con Fmev en estas condiciones, en presencia o no de los inhibidores de Chk1, a las 13 y 15 horas desde la liberación de nocodazol, tiempos estos en los que no se encuentran células en G2 en la condición control. Para ello, una vez más, se sincronizaron las células mediante tratamiento con nocodazol y posterior liberación en presencia o ausencia de Fmev. Los inhibidores UCN01 y NU 6027 se añadieron cuando las células se encontraban al inicio de la fase S, es decir, 11 horas después del lavado del nocodazol. Los resultados se muestran en la **Figura 24** (un caso representativo de los histogramas y diagramas de puntos que ofrece el citómetro) y en la **Figura 25**

(diagrama de barras correspondiente a los resultados de tres experimentos). Lo primero que hay que resaltar es que las células tratadas con Fmev, mayoritariamente en fase S, no presentan incremento de ciclina B1. Los cultivos sometidos al tratamiento con los inhibidores de Chk1, en cambio, mostraban incrementos de la proteína a pesar de encontrarse en fase S. En el caso de NU 6027 el aumento de ciclina B1 se produce a las 2 horas de la adición del compuesto al medio (13 horas tras la liberación de nocodazol) mientras que a las 15 horas vuelve a disminuir a pesar de encontrarse las células en la fase S en ambos casos. El tratamiento con UCN01, en cambio, produjo un incremento de ciclina B1 que se mantuvo en los dos tiempos estudiados.

En el caso de la combinación de los inhibidores de Chk1 con Fmev se observa que se produce un aumento importante de la presencia de células positivas para ciclina B1 a las 15 h de la liberación de nocodazol en el caso de NU 6027 y sólo un pequeño incremento a las 13 horas en el caso de UCN01 (**Figura 24** y **Figura 25**).

A continuación quisimos comprobar si estos incrementos extemporáneos de la proteína se traducían en una aceleración de las mitosis y en ese caso, si las mitosis eran normales o por el contrario eran aberrantes. Para ello se llevó a cabo un estudio por inmunocitoquímica en el que se marcaron por un lado los núcleos con Hoescht 33258- para confirmar la condensación extemporánea de la cromatina y diferenciar núcleos interfásicos (en G0/G1 y S) de aquellos en alguna de las fases de la mitosis- y por otro de la proteína α -tubulina para determinar, a través de la formación del huso mitótico, si las mitosis eran normales. El diseño del experimento fue el mismo que se utilizó en los experimentos anteriores (**Figura 26** y **Figura 27**) para el estudio de la expresión de ciclina B1. De nuevo se analizaron los tiempos de 13 y 15 horas desde la liberación de nocodazol. Lo primero que observamos es que en la condición control, a las 13 horas de liberación de nocodazol - donde no se observaba incremento de ciclina B1- no hay células en mitosis, siendo los núcleos interfásicos, sin cromatina condensada y sin que haya formación del huso mitótico (**Figura 26** y **Figura 27**). Se observa una organización normal del citoesqueleto sin alteraciones aparentes. Dos horas mas tarde, de acuerdo con el ligero incremento de ciclina B1, comienzan a aparecer células mitóticas.

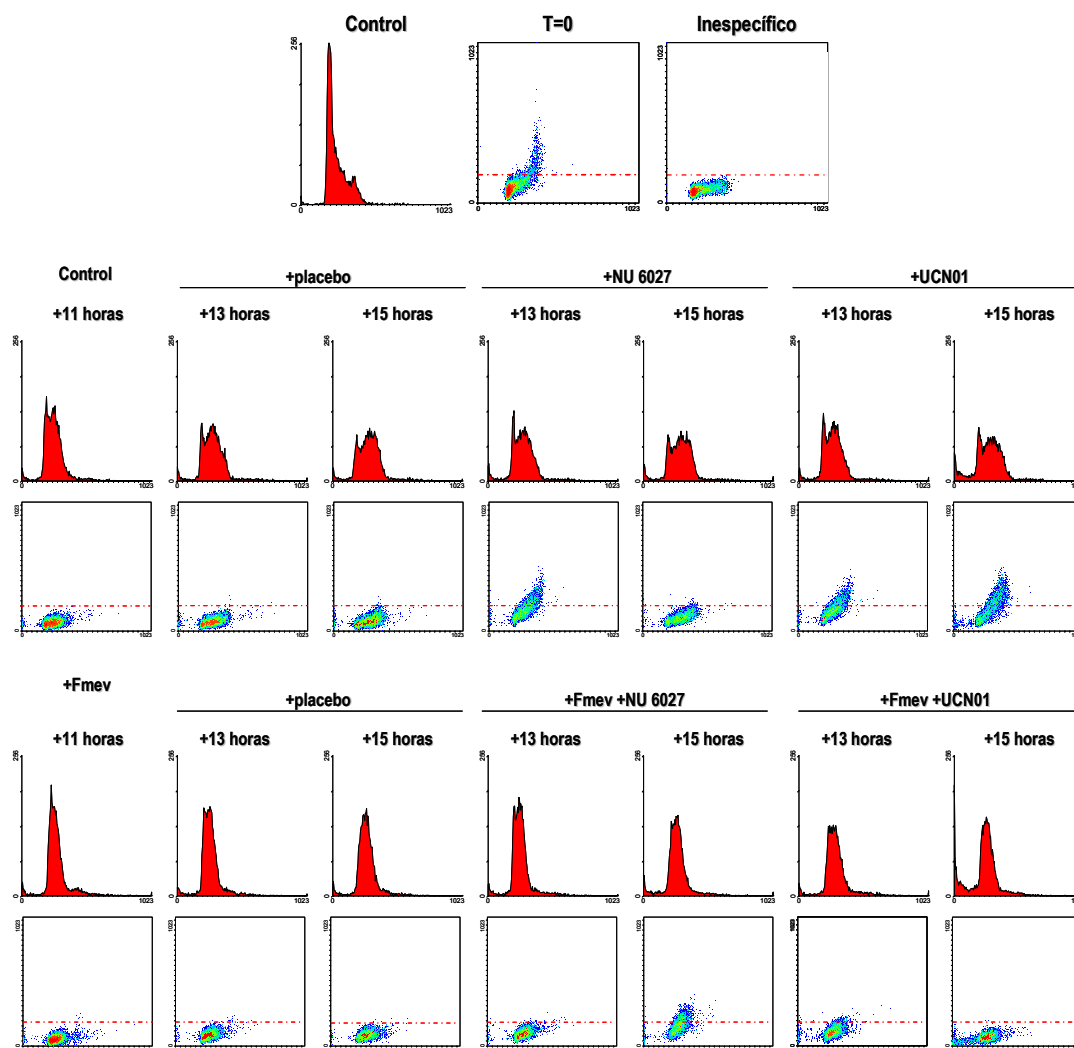


Figura 24. Estudio de la expresión de ciclina B1 en células HL-60 tratadas con fluoromevalonato y por inhibición de ATR y Chk1. Se repitió el diseño del experimento de la figura 22. Se muestra la distribución del ciclo celular y la expresión de la ciclina B1. Para ello se llevó a cabo un doble marcaje del ADN (yoduro de propidio) y de la ciclina B1 con anticuerpos específicos y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo. Los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de 4. La inespecificidad del anticuerpo se testó añadiendo a la muestra únicamente anticuerpo secundario. La línea punteada de color rojo indica el límite por encima del cual se considera la presencia de células positivas para la proteína.

Dichas mitosis son normales y presentan husos mitóticos sin alteraciones (**Figura 26 y Figura 27**).

En el caso de las células tratadas con Fmev, que se encontraban mayoritariamente en fase S y que no mostraron incremento alguno de ciclina B1, no se observó presencia de células en mitosis en ninguno de los tiempos estudiados, confirmando de este modo una vez más el bloqueo en fase S provocado por dicho inhibidor. Se puede decir, a la vista de estos datos, que el Fmev no produce una aceleración de la entrada en mitosis ni cambios importantes en la

organización del citoesqueleto. Sí se observa, no obstante, que los núcleos de las células tratadas con Fmev son más grandes que los de las células no tratadas (control).

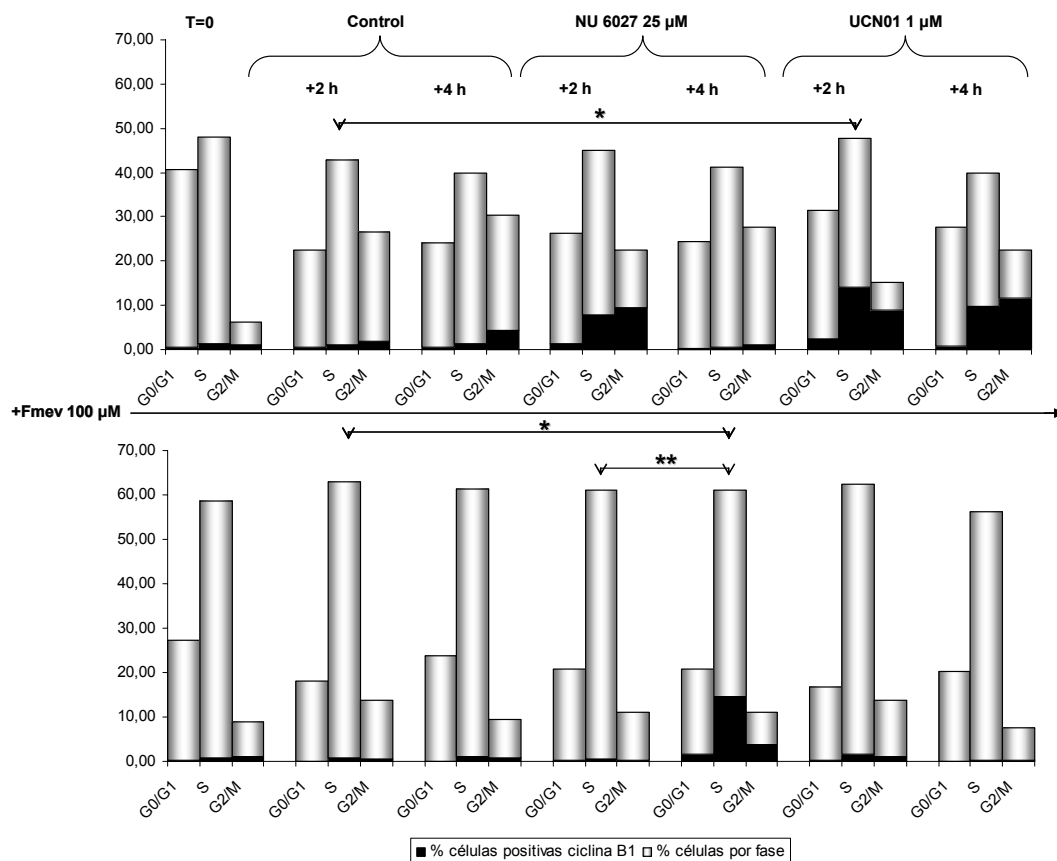


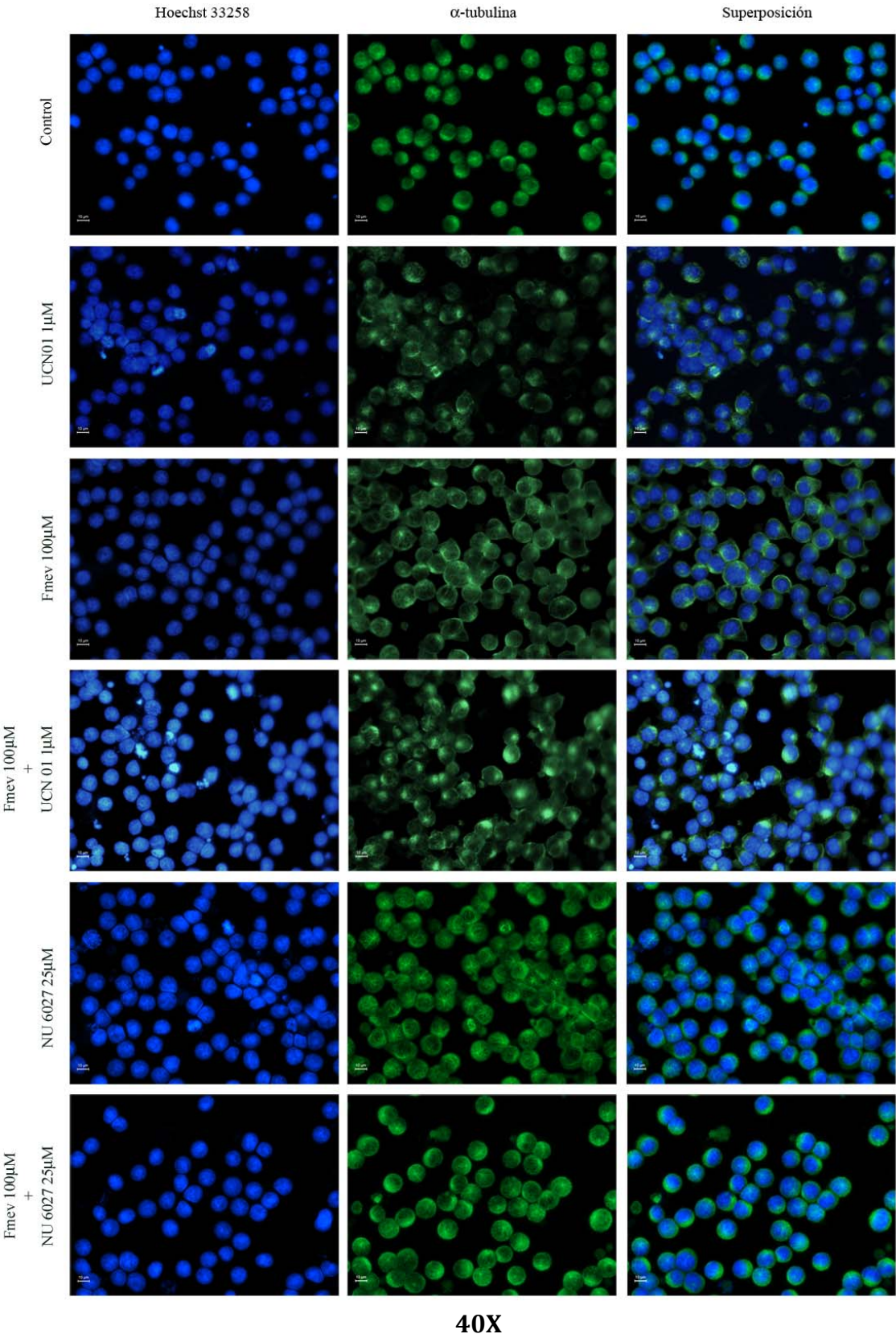
Figura 25. Análisis estadístico de la expresión de ciclina B1 en células HL-60 tratadas con fluoromevalonato y por inhibición de ATR y Chk1. La presencia de células positivas para ciclina B1 por efecto de los distintos tratamientos se analizó por test ANOVA de tres vías considerando como factores el tiempo, la presencia de Fmev y la presencia de UCN01, NU6027 o ninguno de los dos inhibidores. El test mostró diferencias significativas, por lo que se analizaron por el test de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparaciones múltiples. Los asteriscos muestran las condiciones en las que la expresión de ciclina B1 se incrementa de forma estadísticamente significativa respecto a las condiciones indicadas por las flechas. (* P < 0,05; ** P < 0,005).

El tratamiento con los inhibidores de ATR o de Chk1 produjo importantes cambios. La adición de UCN01 a las células que se encontraban en fase S, que producía un incremento importante de la expresión de ciclina B1, aceleró la entrada en mitosis como lo demuestra la presencia de células en profase y metafase fundamentalmente. La presencia de células mitóticas es patente tras dos horas de presencia del inhibidor y se incrementa a las 4 horas de su adición (**Figura 26** y **Figura 27**). El análisis de la α -tubulina revela que los husos mitóticos son aparentemente normales, con dos polos enfrentados, aunque encontramos

células en mitosis con cromosomas sueltos, no anclados al huso mitótico (**Figura 27**), las células se indican con flechas blancas). En el caso de la inhibición de ATR con NU 6027 también se observa incremento de la presencia de células mitóticas que es mayor durante las primeras dos horas de incubación con el inhibidor que tras 4 horas de tratamiento. En este caso, el análisis de la α -tubulina muestra husos mitóticos normales y de hecho encontramos células en anafase (**Figura 27**). También se observan células multipolares, aunque no podemos afirmar que sea producto del tratamiento porque es algo que ocurre ocasionalmente en las células en cultivo. Tampoco puede descartarse que el tratamiento con NU 6027 esté afectando a la duplicación de los centrosomas.

La adición de NU 6027 a las células tratadas con Fmev, como cabía esperar a la vista de los datos de citomería, resultó en la aparición de células mitóticas a las 4 horas de la adición del inhibidor de ATR pero no a las 2 horas (**Figura 26 y Figura 27**), lo que está de acuerdo básicamente con los datos de ciclina B1. Dichas mitosis, en ninguno de los casos, progresaron más allá de metafase y los husos mitóticos parecían ligeramente alterados. En la imagen que se muestra a modo de ejemplo vemos una célula en prometafase que tiene un único polo (**Figura 27**). La adición de UCN01 a las células tratadas con Fmev produjo evidentes efectos en la morfología celular. Aunque la ciclina B1 se incrementara sólo ligeramente por efecto de la inhibición directa de la Chk1, en estas condiciones tradujese observó un aumento importante de la población de células en mitosis a las 13 horas desde la liberación de nocodazol (2 horas con UCN01). A diferencia de lo observado en las células tratadas únicamente con UCN01, en este caso se trata de mitosis aberrantes, con cromatina condensada sin formación del huso mitótico o husos anormales, que da lugar a situaciones como la que se observa en la **Figura 26**, en la que la cromatina se condensa formando los cromosomas pero estos están dispersos al no tener microtúbulos del huso a los que unirse. Tras 4 horas en presencia de UCN01 aun se observan células con cromatina condensada, pero hay un aumento importante del número de células muertas (**Figura 27**), las células muertas se indican con flechas rojas), algo que ya se observó mediante citometría y, como proponíamos, son estructuras aberrantes que parecen avocar a la célula a la muerte desde mitosis. Estos datos indican que la inhibición de Chk1 en células sometidas al estrés genotóxico provocado por Fmev, produce una condensación

prematura de la cromatina con formación anormal del huso mitótico, que da como resultado mitosis aberrantes. Esta situación termina produciendo la muerte celular.



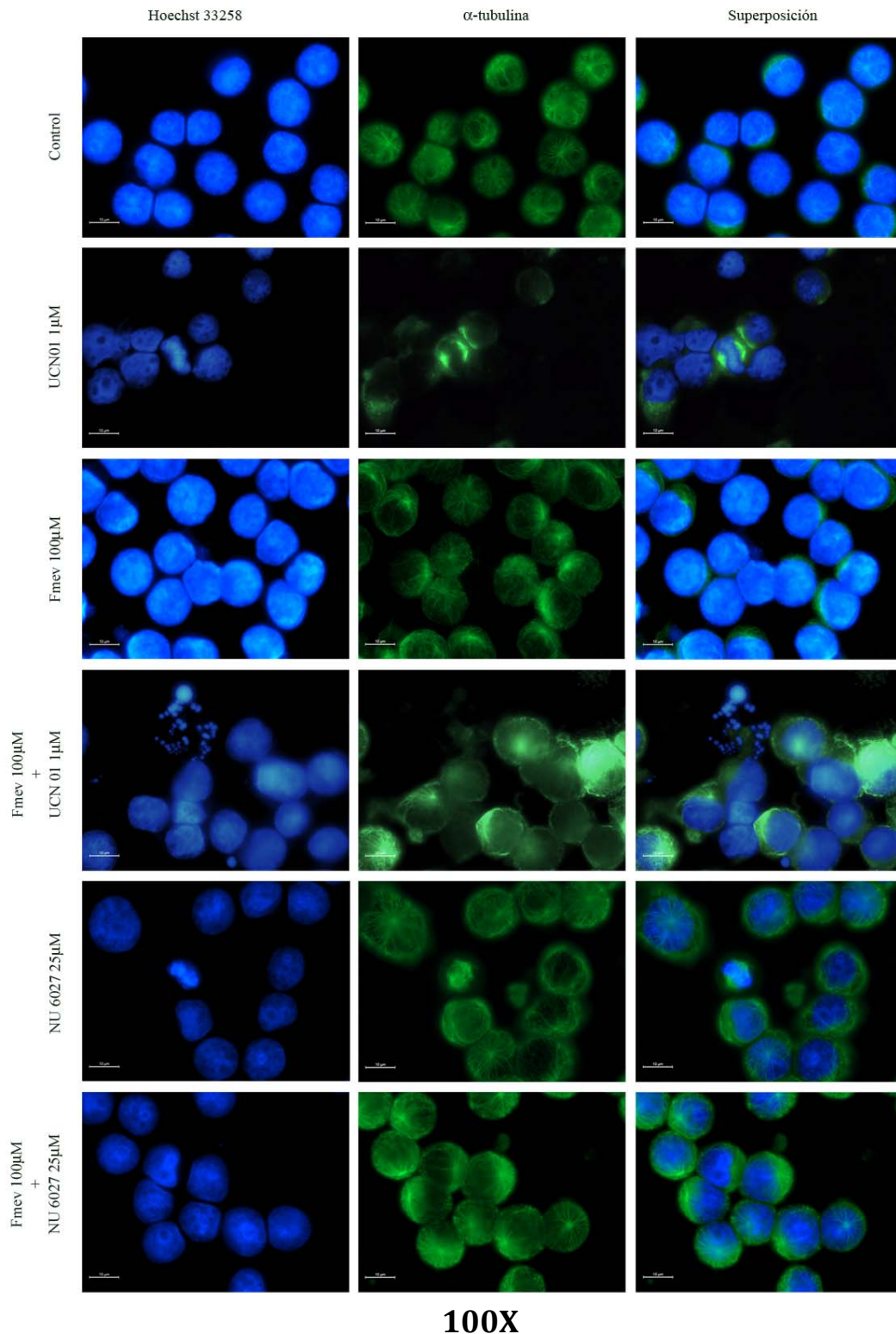
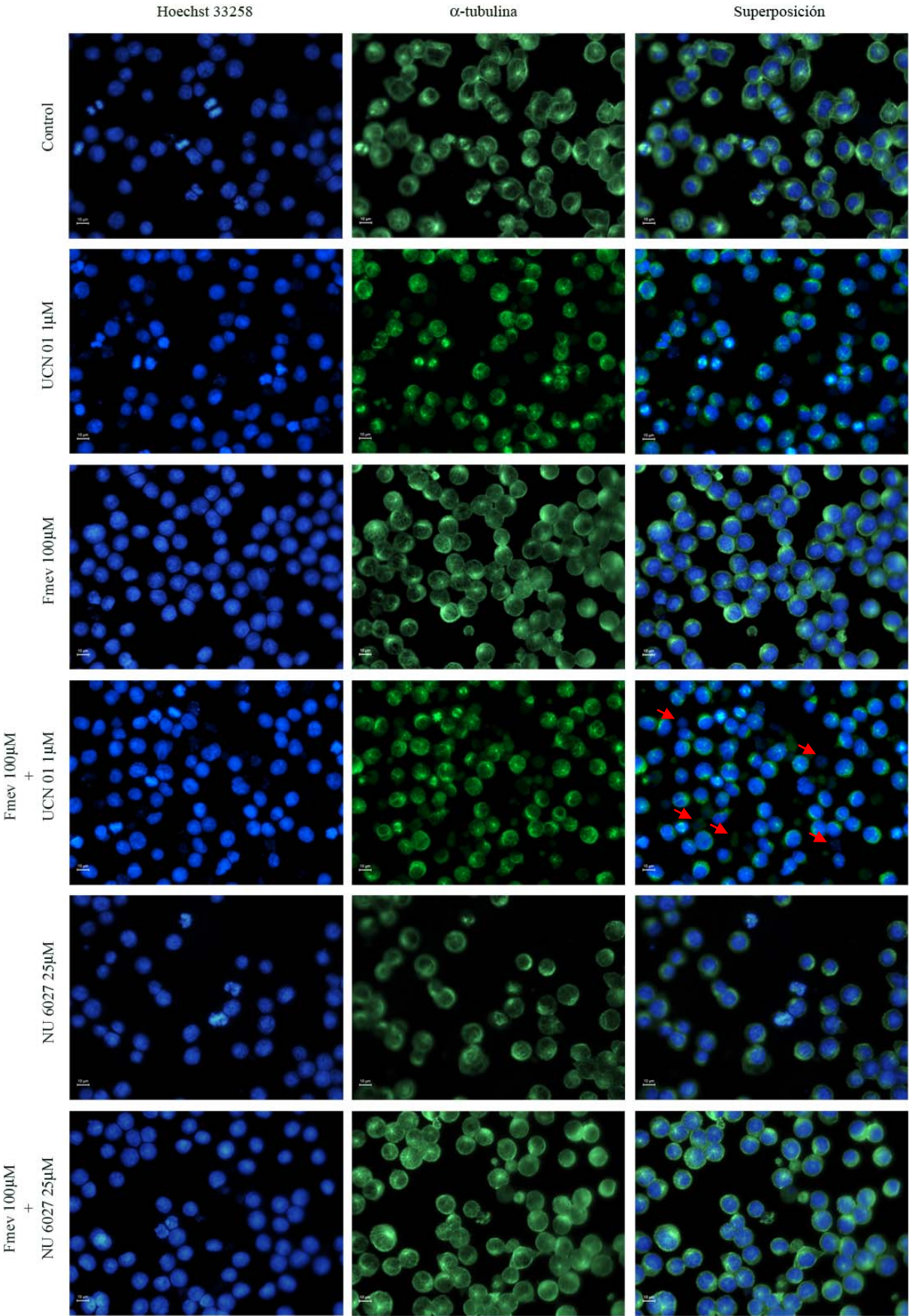


Figura 26. Análisis de la presencia de mitosis aberrantes en células HL-60 sincronizadas tratadas con fluoromevalonato e inhibidores de ATR y Chk1 a las 13 horas de la liberación de nocodazol. Las células HL-60 se trataron del mismo modo que se hizo para el análisis de la expresión de ciclina B1 y tras 13 horas desde la liberación de nocodazol (12 horas con Fmev y 2 en presencia de los inhibidores) se fijaron para el análisis por inmunocitoquímica de los husos mitóticos (proteína α -tubulina en color verde) y los núcleos que se tiñieron con Hoescht-33258 (azul). Se visualizaron por microscopía de fluorescencia con el objetivo de 40X y 100X con aceite de inmersión.



40X

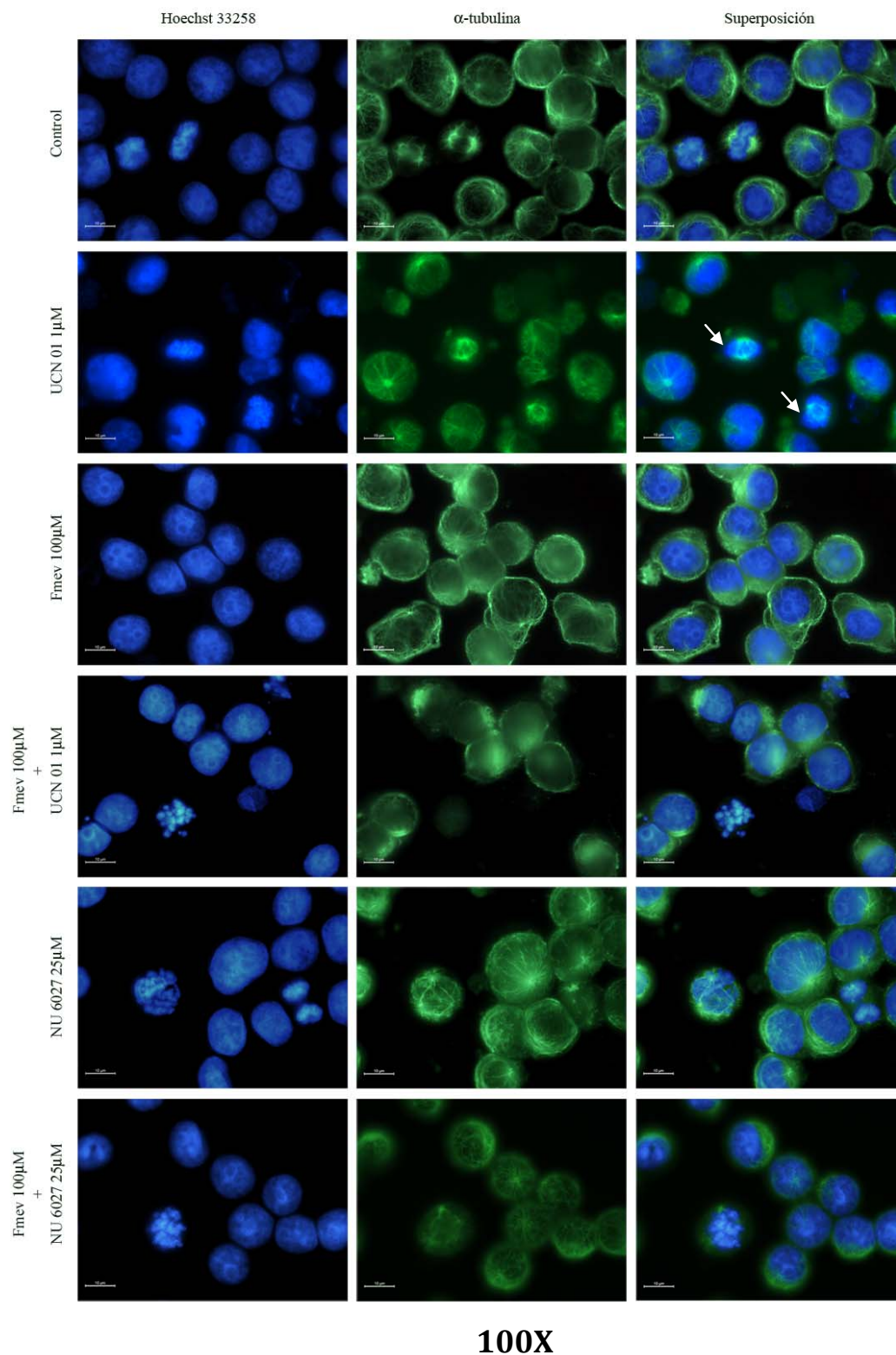


Figura 27. Análisis de la presencia de mitosis aberrantes en células HL-60 sincronizadas tratadas con Fmev e inhibidores de ATR y Chk1 a las 15 horas de la liberación de nocodazol. Las células HL-60 se trataron del mismo modo que se hizo para el análisis de la expresión de ciclina B1 y tras 13 horas desde la liberación de nocodazol (12 horas con Fmev y 2 en presencia de los inhibidores) se fijaron para el análisis por inmunocitoquímica de los husos mitóticos (proteína α -tubulina en color verde) y los núcleos que se tiñieron con Hoescht-33258 (azul). Se visualizaron por microscopía de fluorescencia con el objetivo de 40X y 100X con aceite de inmersión.

4.5 IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE AMPK EN LOS EFECTOS DEL FLUOROMEVALONATO SOBRE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR

4.5.1. Activación de AMPK por efecto de fluoromevalonato

Otra de las vías estudiadas fue la de AMPK, que generalmente se activa como respuesta al estrés metabólico y que tiene, además, un papel fundamental en la progresión del ciclo celular. Para determinar si la proteína AMPK estaba implicada en los efectos observados con Fmev, primeramente se analizó la expresión de la proteína por *western blot*. Para ello, se incubaron las células HL-60 en presencia de Fmev 100 μ M y se estudió la expresión de fosfo-AMPK a las 3, 6, 9, 12 y 24 horas de tratamiento (**Figura 28**). Los resultados muestran que el tratamiento con Fmev produce un rápido e intenso incremento de la forma activa de la proteína que fue estadísticamente significativo a las 3 y las 24 horas de tratamiento, manteniéndose en todo momento por encima del control.

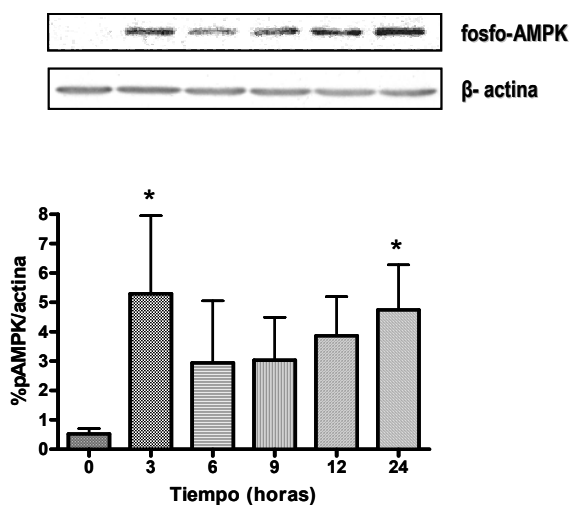


Figura 28. Efecto del fluoromevalonato sobre la activación (fosforilación) de la proteína AMPK. Las células HL-60 se trataron con Fmev 100 μ M. A los tiempos indicados se tomaron muestras y se analizaron por citometría de flujo para comprobar la parada en fase S. A continuación se analizaron las muestras por western blot con 50 μ g de proteína total utilizando anticuerpos específicos para pAMPK. Las imágenes superiores corresponden a un experimento representativo y la gráfica inferior a la media \pm EE de la cuantificación de la densidad óptica de las bandas de cada proteína de un total de 3 experimentos. Los efectos de los distintos tratamientos

se analizaron por test de ANOVA que fue significativo. Se analizaron entonces por el test de Tukey para comparaciones múltiples. Los asteriscos indican los tiempos en los que la forma fosforilada de la proteína se incrementa de forma estadísticamente significativa respecto al control (* $P < 0,05$)

4.5.2. Cambios en el contenido celular de ATP por efecto de fluoromevalonato

La proteína AMPK se activa en respuesta a descensos del cociente ATP/AMP. Con el fin de determinar si el contenido de ATP se reducía como resultado del tratamiento de las células HL-60 con Fmev, las células se incubaron en presencia del inhibidor y se midió el contenido de ATP a los mismos tiempos a los que se

observó el incremento de la forma fosforilada de la proteína. Como se puede observar en la **Figura 29** el contenido de ATP en las muestras se reducía ya en las primeras horas de tratamiento coincidiendo con el tiempo en el que se empieza a observar la acumulación de las células en la fase S del ciclo celular. En tiempos posteriores el contenido de ATP permanece por debajo de los valores del control.

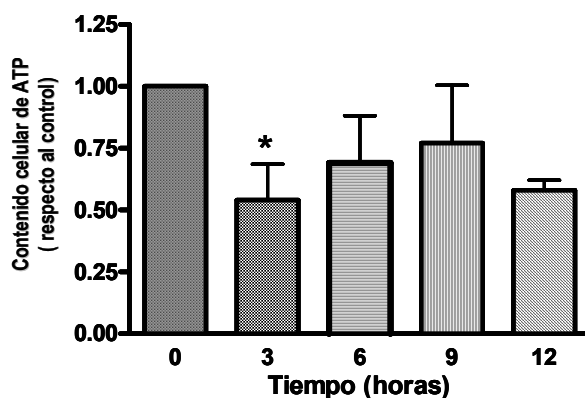


Figura 29. Efecto del fluoromevalonato 100 μ M sobre el contenido de ATP de las células HL-60. Los efectos del tiempo de tratamiento se analizaron por test de ANOVA que resultó significativo y posteriormente por el test de Tuckey para comparaciones múltiples. * indica que las diferencias son estadísticamente significativas respecto al tiempo 0 ($P < 0,05$). Se representan las medias \pm DE del contenido celular de ATP respecto al control, de 3 experimentos representativos.

Con el ánimo de demostrar la implicación de la deficiencia de ATP en los efectos del Fmev, se trató de prevenir el descenso de su concentración suministrando altas cantidades de glucosa para incrementar la glucólisis o bien de creatina para facilitar el acopio del fosfágeno. Ambos compuestos se añadieron al cultivo 3 h antes que el Fmev y a las 24 h se contaron las células y se determinó el contenido de ATP. Como puede observarse, la adición de glucosa 10 ó 25 mM no evitó el descenso de la concentración de ATP y tampoco corrigió la inhibición de la proliferación ejercidas por el Fmev. Igualmente, la creatina tampoco evitó ninguno de esos efectos **Figura 30**.

4.5.2.1. Efecto de la inhibición de la producción de ATP

Ante la imposibilidad de prevenir la deficiencia de ATP en las células tratadas con Fmev, se trató de comprobar si la deficiencia de ATP causada por otros medios producía el mismo efecto que el Fmev sobre la proliferación y el ciclo celular.

Concretamente se estudiaron los efectos de la oligomicina y de la 2-deoxy-D-glucosa (2-DG), inhibidores la de fosforilación oxidativa y la glucolisis respectivamente. La oligomicina actúa bloqueando el canal de protones en la fracción F_0 de la ATP sintasa, mecanismo mediante el cual inhibe la fosforilación oxidativa, lo que produce una disminución del contenido de ATP de la célula del mismo orden que el producido por Fmev, como así pudimos comprobar en las células HL-60 (**Figura 31**). La 2-DG es un análogo de la glucosa que se incorpora a la glucolisis pero la inhibe, provocando en este caso un descenso del contenido celular de ATP incluso superior que el Fmev.

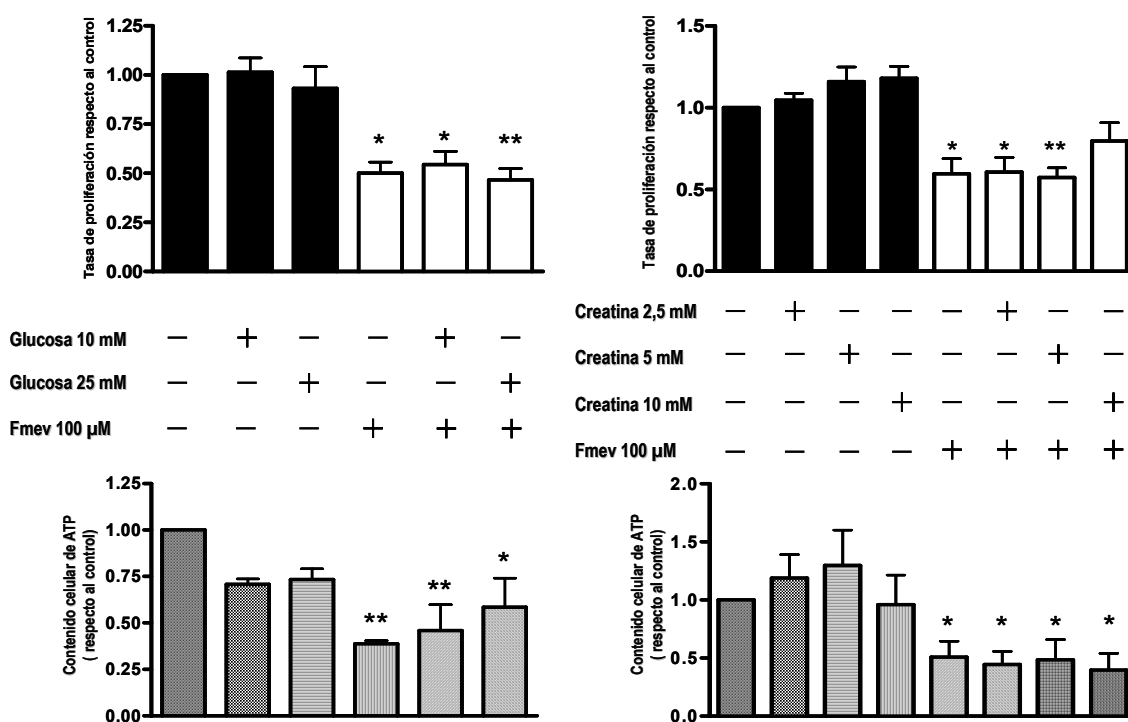


Figura 30. Efecto de la adición de concentraciones crecientes de glucosa o creatina a los cultivos tratados o no con fluoromevalonato 100 μM. Las células HL-60 se trataron durante 24 horas en presencia o ausencia (control) de Fmev 100 μM y las concentraciones indicadas de glucosa (izquierda) o creatina (derecha). Transcurrido ese tiempo se llevaron a cabo contajes del número de células viables y se analizó el contenido de ATP. En las gráficas superiores se representa la tasa de proliferación respecto al control. Las barras de color negro corresponden a las condiciones control (sin Fmev) y las barras de color blanco a las condiciones tratadas con Fmev 100 μM. Las barras muestran la media \pm DE de la tasa de proliferación respecto al control de 3 experimentos representativos. Las gráficas inferiores que corresponden a las variaciones de nmoles deATP/mg de proteína respecto al control. Las barras representan las medias \pm EE de 3 experimentos. En todos los casos, los efectos de los distintos tratamientos se analizaron por ANOVA que fue significativo. Se analizaron entonces por el test de Tukey para comparaciones múltiples. Los asteriscos indican los tiempos en los que la tasa se reduce significativamente respecto al control (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$).

A la vista de los datos en cuanto a ATP se estudió la distribución del ciclo celular, observándose que tanto la oligomicina como la 2-DG producían un descenso de la fase S del ciclo que contrasta con el efecto de Fmev.

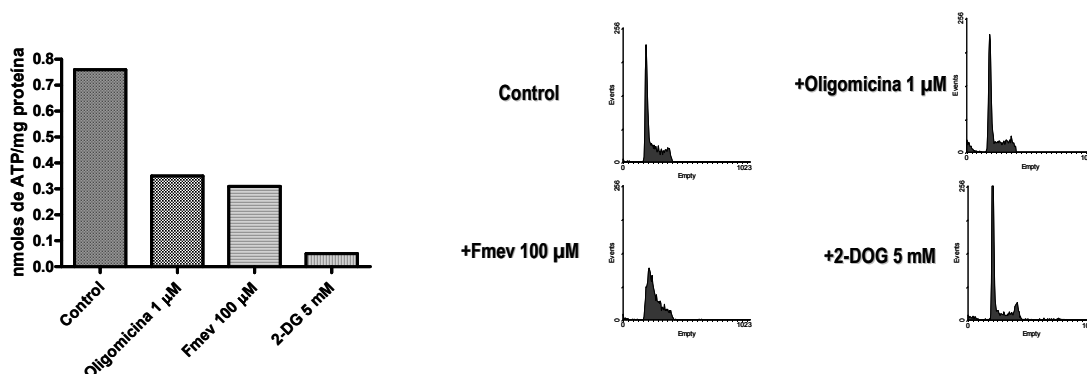


Figura 31. Efecto de la inhibición experimental de la fosforilación oxidativa y la glucólisis sobre la progresión del ciclo celular y el contenido de ATP de células tratadas con fluoromevalonato. Las células HL-60 se trataron con ausencia (control) o presencia de Fmev 100 μ M, oligomicina 1 μ M o 2-deoxyglucosa (2-DG) durante 12 horas. A continuación se tomaron muestras para la determinación del contenido de ATP, la cantidad de proteína y la progresión del ciclo celular por tinción con yoduro de propidio. En la gráfica se representa el contenido de ATP expresado en nmoles de ATP/mg proteína. En paralelo se muestran los histogramas del ciclo celular de cada muestra. Los datos corresponden a un experimento representativo.

4.5.3. Estudio de los efectos de la activación y de la inhibición de AMPK sobre el ciclo celular

Hasta aquí se ha determinado que el tratamiento de las células HL-60 con Fmev produce una disminución del contenido celular de ATP que presuntamente lleva a la activación de AMPK. A partir de aquí nos planteamos la hipótesis de la participación de AMPK en los efectos del Fmev.

En primer lugar estudiamos los efectos sobre la vía de mTOR. Como ya se ha comentado, una de las consecuencias de la activación de AMPK es la inhibición de la vía de mTOR, un regulador clave del crecimiento celular y la proliferación [195]. Para determinar si la inhibición de la proliferación provocada por Fmev estaba mediada por la inhibición que a su vez ejerce AMPK sobre esta proteína, tratamos las células con rapamicina- inhibidor de mTOR- y estudiamos sus efectos sobre la progresión del ciclo celular. El tratamiento con rapamicina 10 ó 100 nM durante 24 horas no tuvo efecto sobre la progresión del ciclo celular ni sobre la síntesis de ADN (**Figura 32**). Estos resultados descartan que la activación de AMPK por Fmev provoque un bloqueo del ciclo celular en fase S por inactivación de la vía de mTOR.

Seguidamente estudiamos el papel de AMPK directamente analizando los efectos de su activación por AICAR [196] y su inhibición con Compuesto C [171].

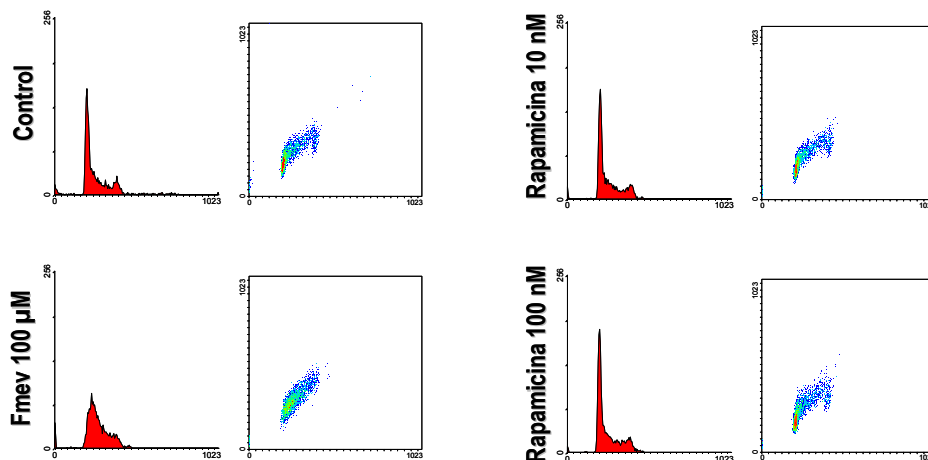


Figura 32. Efecto de la inhibición de mTOR con rapamicina. Las células HL-60 se trataron con rapamicina 10 o 100 nM y los resultados se compararon con los obtenidos en células tratadas con Fmev o inubadas en condiciones controles durante 24 horas. Durante la última hora se añadió a los cultivos BrdU 100 µM y se procesaron para su análisis por citometría de flujo.

Ya había sido descrito por otros autores que la activación de la AMPK por el compuesto AICAR producía una parada del ciclo celular en la fase S en ciertos tipos celulares [178]. Las células HL-60 se incubaron en presencia de dichos compuestos durante 24 h. Primeramente se confirmó mediante *western blot* que AICAR incrementaba los niveles de fosfo-AMPK y que Compuesto C prevenía dicha activación (**Figura 33**).

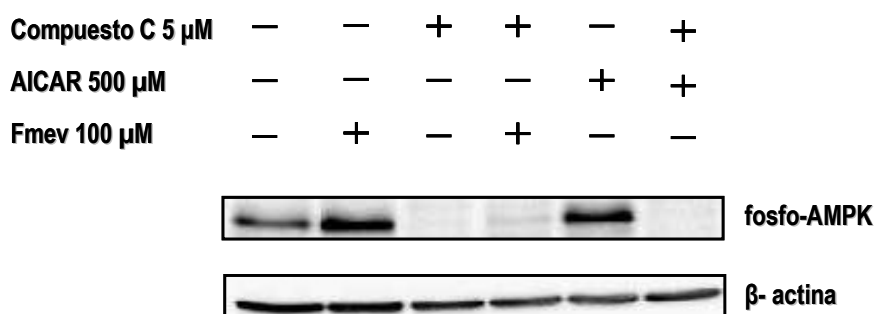


Figura 33. Estudio de la activación (fosforilación) e inhibición de AMPK con AICAR y Compuesto C respectivamente. Las células HL-60 se trataron con AICAR o Compuesto C para determinar la activación (fosforilación) o inhibición de AMPK. En ocasiones los tratamientos se combinaron con Fmev 100µM. En todos los casos se trataron las células durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se tomaron muestras para el análisis de la expresión de la proteína por western blot con 50 µg de proteína total, empleando anticuerpos específicos para fosfo-AMPK. Se empleó β-actina como control de carga.

A continuación se evaluó la proliferación mediante el conteo de las células vivas (**Figura 34**). Tanto AICAR como Compuesto C por separado inhibieron la proliferación celular y, en combinación con el Fmev, ninguno de ellos previno el efecto del inhibidor de la MVD. Lo mismo ocurrió en cuanto al contenido de ATP. Tanto AICAR como Compuesto C por separado, produjeron un descenso de los niveles de ATP respecto al control muy similar al provocado por Fmev y ninguno de los dos fue capaz de revertir el efecto del Fmev (**Figura 35**).

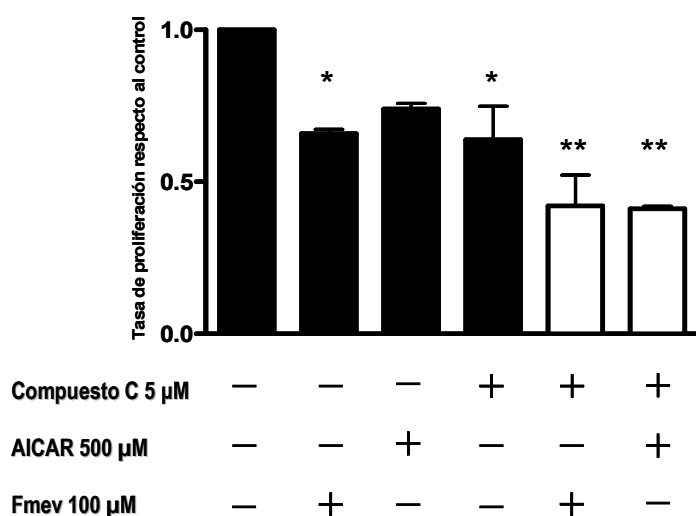


Figura 34. Variaciones en la tasa de proliferación de las células HL-60 por activación o inhibición de AMPK. El experimento se llevó a cabo del mismo modo que para el análisis de la expresión de proteína. En este caso tras 24 horas de tratamiento se tomaron muestras de las distintas condiciones para el estudio del número de células viables. La gráfica representa las medias \pm SD de la variación de la tasa de proliferación respecto al control de 3 experimentos representativos. Las barras de color blanco corresponden a los

tratamientos en los que se combinó Fmev con el activador o el inhibidor de AMPK. Los efectos de los distintos tratamientos se analizaron por test ANOVA que fue significativo. A continuación se llevó a cabo el análisis por el test de Tukey para comparaciones múltiples. Los asteriscos indican aquellas condiciones en las que el descenso en la tasa de proliferación es estadísticamente significativo respecto al control (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$).

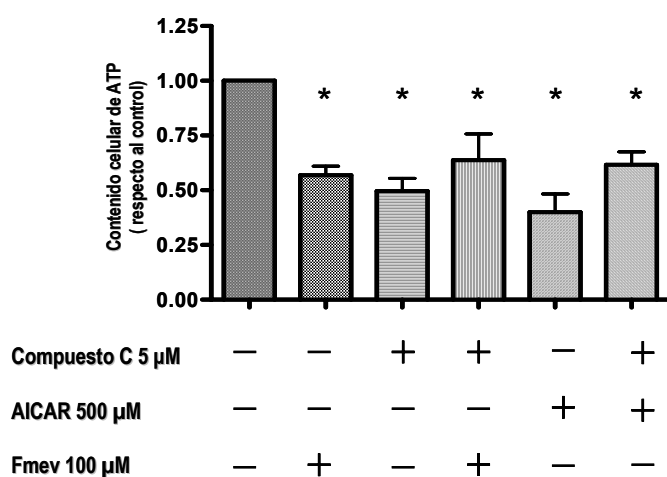


Figura 35. Estudio del contenido de ATP de células HL-60 tras la activación o inhibición de AMPK. Las células HL-60 se trataron en las mismas condiciones que en los casos anteriores, pero tras 24 horas se analizó el contenido de ATP. La gráfica muestra la media \pm EE de 3 experimentos representativos. Los efectos de los distintos tratamientos se analizaron por test ANOVA que fue significativo. A continuación se llevó a cabo el análisis por el test

de Tukey para comparaciones múltiples. Los asteriscos indican aquellas condiciones en las que el descenso en la tasa de proliferación es estadísticamente significativo respecto al control (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$).

A continuación se analizó el ciclo celular y la síntesis de ADN mediante marcaje con yoduro de propidio e incorporación de BrdU (**Figura 24**). Se observa en primer lugar que, como ya se ha adelantado, la activación de AMPK con AICAR produce una alteración del ciclo muy similar a la de Fmev, con un claro incremento del número de células en la fase S. Por su parte, el Compuesto C, produjo una acumulación de células en la fase G2/M del ciclo celular, con descenso en la fase S (**Figura 36**). Por lo tanto, estos datos indican que la inhibición de la AMPK provoca la parada del ciclo celular tanto en la mitosis como en la transición de G1 a S. Esto explicaría la inhibición de la proliferación comentada anteriormente.

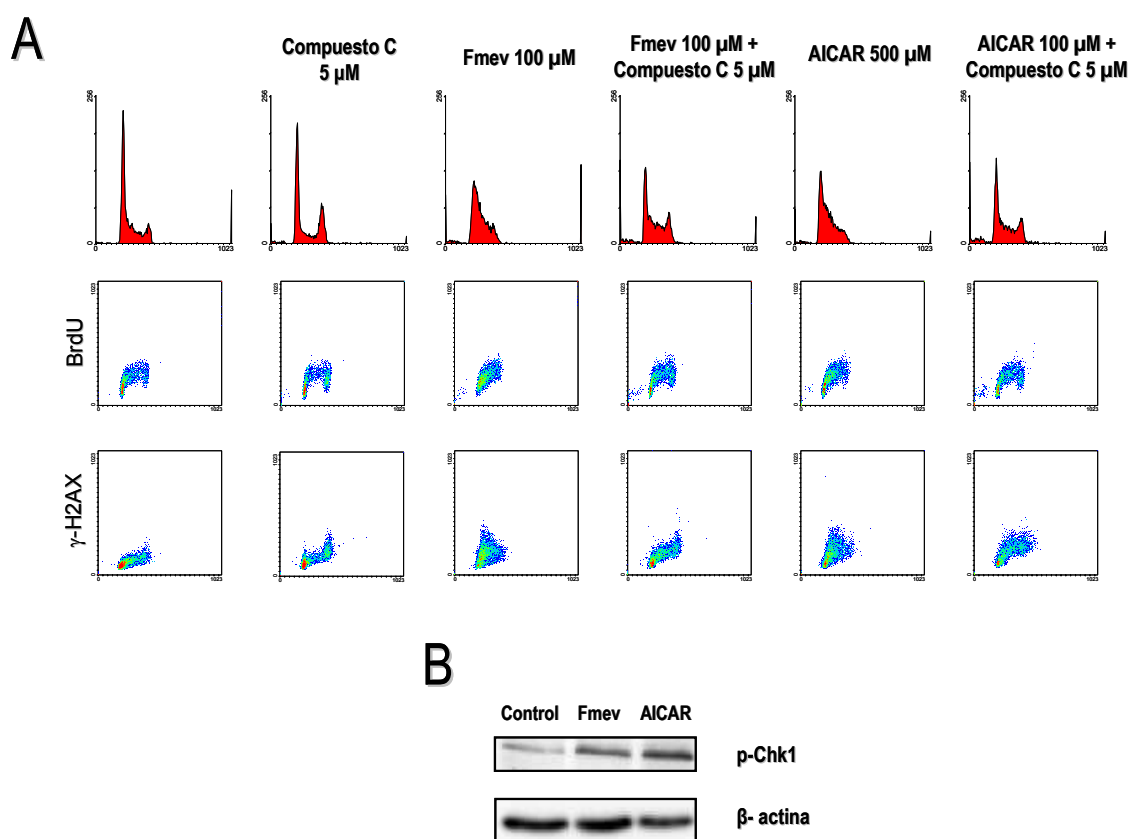


Figura 36. Efecto de la inhibición o activación de AMPK sobre la progresión del ciclo celular, la síntesis de ADN y la presencia de DSBs, en células HL-60 tratadas con fluoromevalonato. A. Las células HL-60 se trataron con AICAR o Compuesto C, solos o en combinación con Fmev durante 24 horas. Una hora antes de la toma de muestras se añadió a los cultivos BrdU para el estudio de la síntesis de ADN. Transcurrido el tiempo de tratamiento se tomaron dos muestras de cada condición, una para el análisis de la incorporación de BrdU y otra para el doble marcaje de la proteína γ -H2AX con un anticuerpo específico y el ADN con yoduro de propidio. Todas las muestras se analizaron en el citómetro de flujo. La figura corresponde a un experimento representativo de 4. **B.** En las mismas condiciones se determinó la expresión de fosfo-Chk1 en células tratadas con AICAR o Fmev. Se analizó la proteína por western blot con 50 μ g de proteína total. Se empleó β -actina como control de carga.

En cuanto a la combinación de Compuesto C con Fmev o AICAR, la distribución del ciclo celular aparentemente se normalizaba por cuanto se reducía la proporción de células en S y se incrementaba la de G2/M en relación a lo que se observaba en las células tratadas con Fmev o AICAR separadamente (**Figura 36.A**). Además, la presencia de Compuesto C reducía ligeramente el marcaje para γ -H2AX (daño en el ADN) en las células tratadas con Fmev o AICAR (**Figura 36.A**). Todo ello parecía indicar que la inhibición de AMPK prevenía los efectos de AICAR y de Fmev. Sin embargo, la realidad era que las células tratadas con Compuesto C no proliferaban (**Figura 34**), de manera que cabía la posibilidad de que la imagen del ciclo estuviera dando una falsa impresión de normalidad. Como se partía de células asincrónicas nos planteamos que el incremento en el número de células en G2/M y el descenso en S al combinar Compuesto C con Fmev o AICAR no fuera el resultado de la anulación de la parada en S sino del bloqueo en G1 y en G2/M que produce el Compuesto C.

Para apoyar esta hipótesis comprobamos si Chk1 también se activaba por tratamiento con AICAR. Para ello se analizó la expresión de la forma fosforilada de la proteína por *western blot* y se confirmó que, efectivamente, fosfo-Chk1 se incrementaba por tratamiento con AICAR prácticamente en la misma medida que lo hacía con Fmev (**Figura 36.B**)

Para profundizar en ello se llevó a cabo un estudio en células sincronizadas con nocodazol con el diseño anteriormente expuesto. Como puede observarse en la **Figura 37**, las células liberadas en presencia de Fmev quedan bloqueadas en fase S como ya se había visto anteriormente, mientras que las células a las que se añadió Compuesto C progresan hasta G2/M pero quedan bloqueadas en dicha fase por la deficiencia de AMPK. La combinación de ambos inhibidores no sólo no permitió la progresión de las células a G2/M, sino que además incrementó considerablemente el número de células muertas.

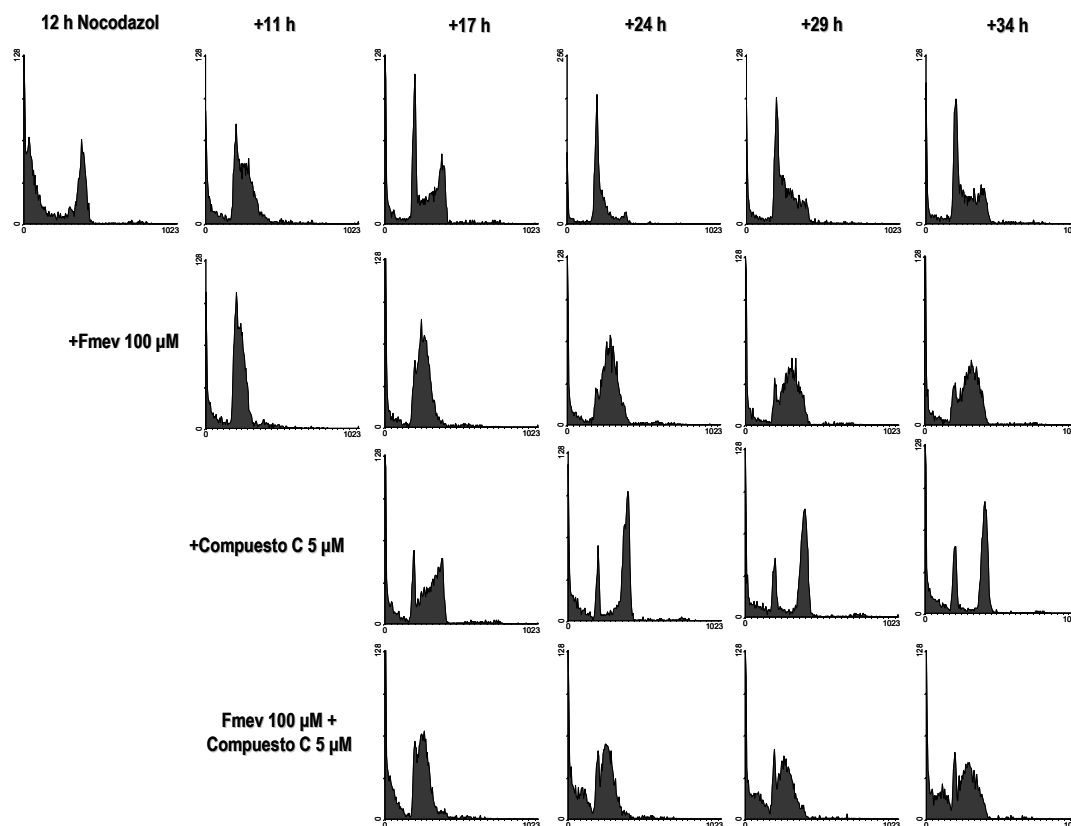


Figura 37. Efecto de la inhibición de AMPK en células sincronizadas tratadas con fluoromevalonato. Las células HL-60 se sincronizaron en prometafase por tratamiento con nocodazol 0,15 $\mu\text{g/ml}$ durante 12 horas. A continuación se eliminó el compuesto del medio y se dejaron ciclar en medio fresco durante 1 hora. A ese tiempo se añadió a una parte de los cultivos Fmev 100 μM y a otros EtOH (vehículo). Tras 11 horas se añadió a los cultivos Compuesto C en combinación o no con Fmev y en estas condiciones se incubaron durante 4 horas más. A los tiempos indicados se tomaron muestras para el análisis de la distribución del ciclo celular por tinción del ADN con yoduro de propidio. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo. Los datos mostrados en la figura corresponden a un experimento representativo de 2.

4.6 IMPLICACIÓN DEL COLESTEROL Y LOS INTERMEDIARIOS DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE COLESTEROL EN EL EFECTO DEL FLUOROMEVALONATO

4.6.1. Papel del mevalonato y sus derivados isoprenoides no esteroides

Numerosos estudios previos han demostrado la importancia de los diferentes intermediarios de la ruta de biosíntesis de colesterol en la proliferación y la progresión del ciclo celular. Concretamente los derivados isoprenoides de la ruta tienen papeles fundamentales en la proliferación celular. Para determinar si el tratamiento con Fmev provocaba una deficiencia de estos compuestos suficiente como para inducir los efectos observados, se estudió si la adición de geranilgeraniol difosfato y farnesil difosfato al medio de cultivo prevenía la

acumulación de células en fase S. Los efectos sobre la distribución del ciclo celular y la incorporación de BrdU al ADN se muestran en la **Figura 38**. En las células tratadas con Fmev 100 μ M se observa una vez mas la acumulación de células en fase S y la desaparición de las células en fase G2/M. La adición de geranilgeraniol o farnesol al medio de cultivo no evitó estos efectos lo que pone de manifiesto que la parada selectiva de las células en fase S no es debida a una deficiencia de estos isoprenoides (**Figura 38.A**).

Para terminar de descartar la necesidad de derivados de mevalonato como causa de la parada en S se añadió este compuesto a los cultivos. Se comprobó que la adición de mevalonato no sólo no permite a las células progresar a través de S sino que parece potenciar el efecto del inhibidor aumentando, además, el número de células muertas (**Figura 38.B**).

Un aumento del efecto de Fmev por mevalonato debía corresponderse con un incremento en el daño en el ADN. Para confirmar este dato se llevó a cabo un estudio de la presencia de la proteína γ -H2AX en estas condiciones, donde se observó que el tratamiento con Fmev y mevalonato incrementa considerablemente el marcaje de para esta proteína (**Figura 39**).

4.6.2. Papel del colesterol

A las dosis habitualmente utilizadas en este trabajo (100 μ M), el Fmev reduce la biosíntesis de colesterol pero no la anula (ver apartado 1) y, de hecho, la concentración de colesterol en las células apenas disminuye. No obstante, quisimos analizar el efecto del suministro de colesterol a las células utilizando como fuente LDL, habida cuenta de la elevada expresión de receptor de LDL (LDLR) por los linfocitos en general y las células HL-60 en particular [28]. Para ello, las células HL-60 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de Fmev 100 μ M y se suplementó el medio con dosis crecientes de colesterol LDL, contándose el número de células viables a diferentes tiempos (Figura 40). El tratamiento simultáneo con dosis de LDL de 10 μ g/ml apenas tuvo efecto sobre la proliferación de las células tratadas con Fmev ni a las 24 ni a las 48 horas de incubación.

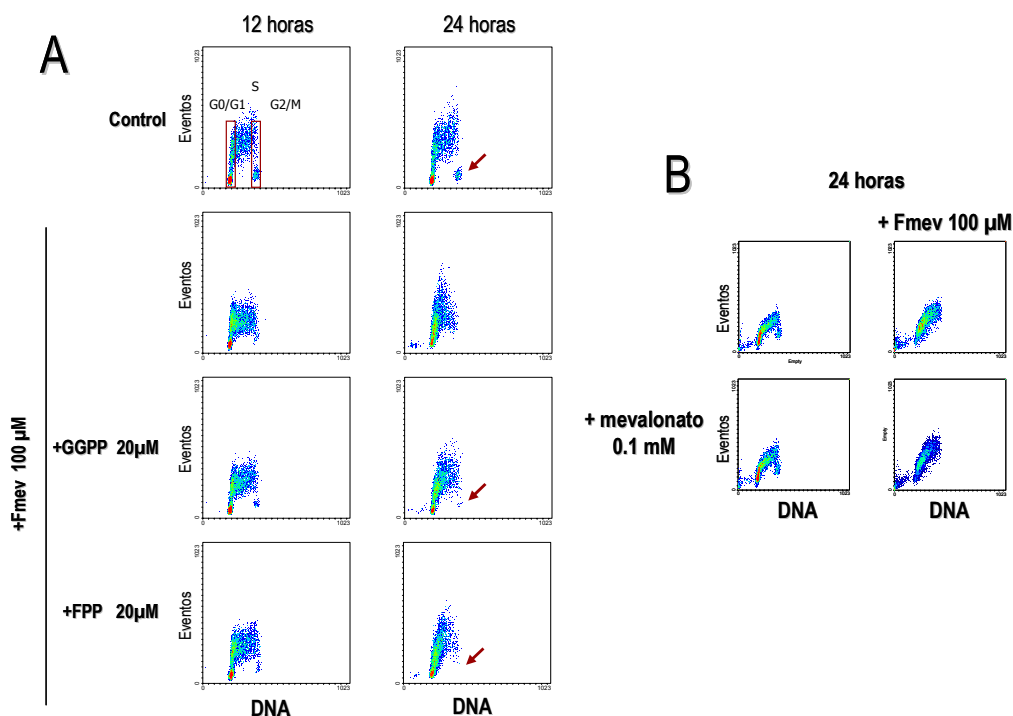


Figura 38. Estudio de los efectos de la adición de farnesol, geranilgeraniol y mevalonato sobre la síntesis y la proliferación celular células HL-60 tratadas con fluoromevalonato. Las células HL-60 se incubaron en presencia de Fmev 100 μ M en combinación o no con farnesil difosfato (FPP) o geranilgeraniol difosfato (GGPP) 20 μ M (A) o mevalonato 0.1 mM (B). Previamente a la toma de muestras se incubaron en presencia de BrdU y a los tiempos indicados se tiñeron con yoduro de propidio para un posterior análisis de la distribución del ciclo y la síntesis de ADN en el citómetro de flujo. La flecha señala la población de células en G2/M, que no incorporan BrdU, que está prácticamente ausente en las células incubadas con Fmev.

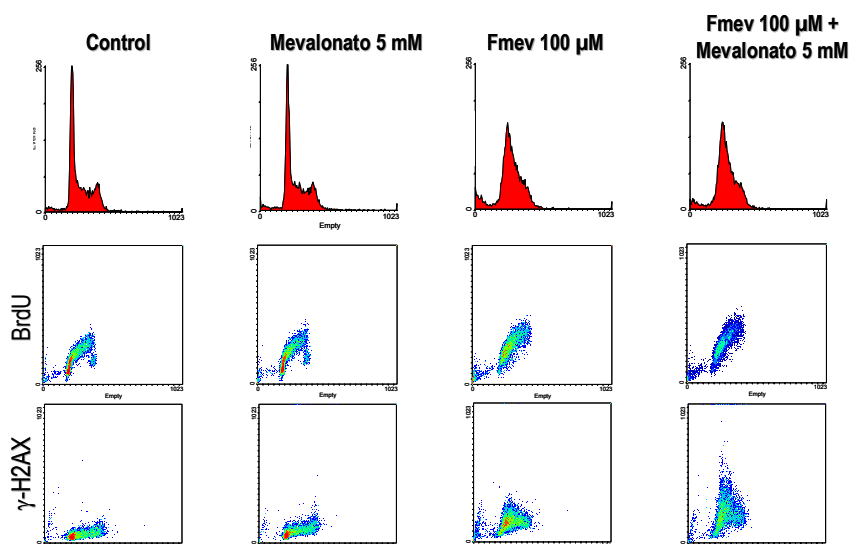
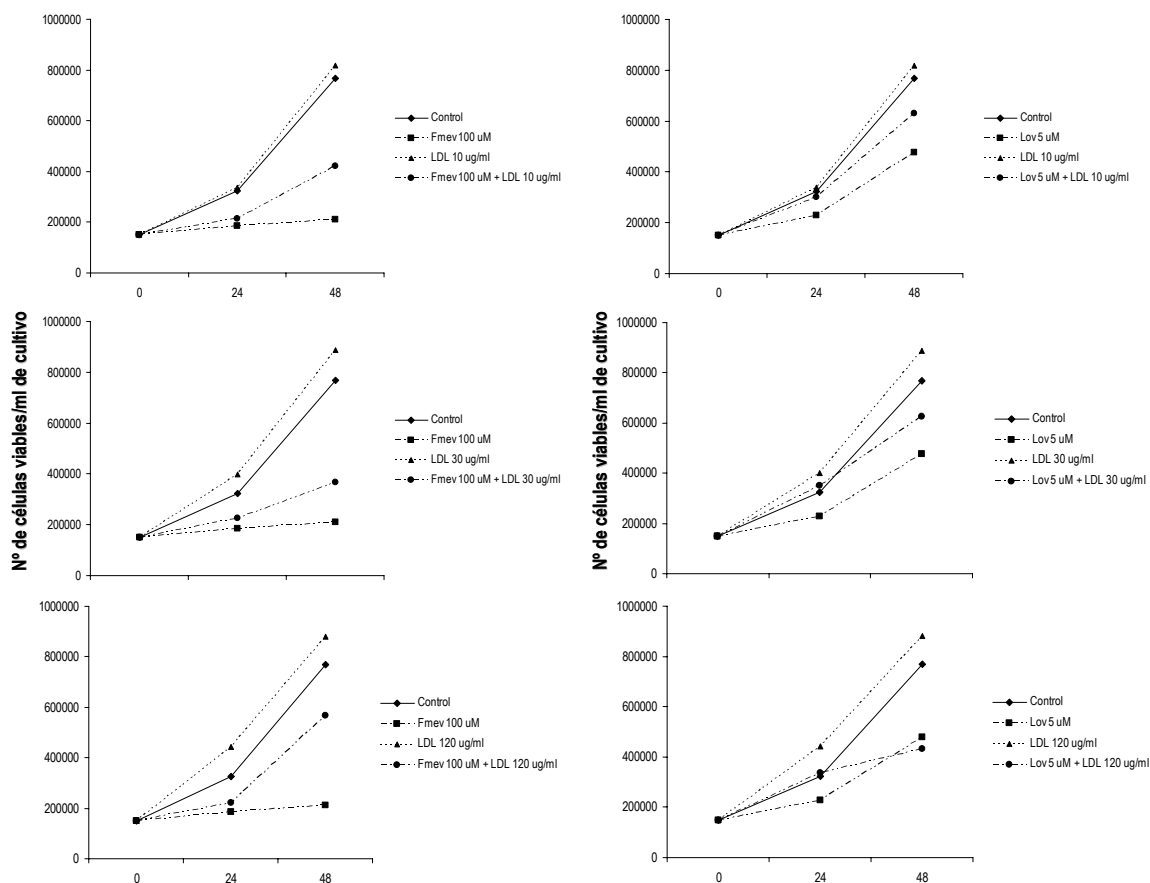


Figura 39. Efecto del mevalonato sobre la distribución del ciclo celular, la síntesis de ADN y el incremento de γ -H2AX en células tratadas con fluoromevalonato. Las células HL-60 se trataron en ausencia (control) o presencia Fmev, mevalonato o ambos durante 24 horas. Una hora antes de la toma de muestras se añadió a los cultivos BrdU para el estudio de la síntesis de ADN. Transcurrido el tiempo de tratamiento se tomaron dos muestras de cada condición, una para el análisis de la incorporación de BrdU y otra para el doble marcaje de la proteína γ -H2AX con un anticuerpo específico y el ADN con yoduro de propidio. Todas las muestras se analizaron en el citómetro de flujo. La figura corresponde a un experimento representativo de 3.

El aumento de dosis de LDL, en cambio, sí incrementó el número de células viables, efecto que era dependiente de la dosis y del tiempo de tratamiento. La situación más favorable se logró a las 48 h tras la adición de LDL 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$, donde la proliferación de las células tratadas con Fmev alcanzó aproximadamente un 75% con respecto al control.

En paralelo a estos experimentos se analizó el efecto que la adición de colesterol LDL a células tratadas con lovastatina 5 μM (Figura 40). Como se puede observar, las dosis de LDL 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ revierten el efecto de la lovastatina en cuanto al número de células viables, mientras que la dosis de 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que sí fue efectiva previniendo el efecto del Fmev, no previene la proliferación de las HL-60 cuando se combina con lovastatina.



A continuación se llevó a cabo un estudio de la distribución del ciclo celular en estas condiciones, con la hipótesis de que el incremento de la proliferación celular producida por las LDL en las células tratadas con Fmev debía acompañarse de una normalización del ciclo. Los resultados muestran una distribución del ciclo prácticamente normal en las células tratadas con Fmev a las 48 h de cultivo con la dosis más alta de LDL (**Figura 25.A**). Por último, se evaluó el daño en el ADN mediante el análisis de la expresión de proteína γ -H2AX por citometría. Como se puede observar en la **Figura 25.B**, el incremento del número de células positivas para la proteína γ -H2AX producido por el tratamiento con Fmev se redujo por efecto de la adición de LDL, desapareciendo prácticamente las células positivas a las 48 h en las expuestas a LDL 120 μ g/ml. El conjunto de estos resultados apuntaban a que los efectos del Fmev podrían deberse a una deficiencia de colesterol. Sin embargo, esto entraba en franca contradicción con los resultados de composición de las células.

4.6.3. Inhibición de HMG-CoA reductasa con lovastatina

Habiendo observado que la adición de mevalonato lejos de prevenir o atenuar el efecto del Fmev aún lo agravaba más, y teniendo en cuenta que el colesterol procedente de las LDL puede reprimir la expresión de la HMG-CoA reductasa [197], nos planteamos la hipótesis de que el efecto protector del colesterol se debía a la inhibición de esta enzima, con la consiguiente disminución de la disponibilidad de mevalonato.

En los primeros experimentos del trabajo en los que se estudiaron los efectos del Fmev sobre la biosíntesis de colesterol comprobamos como el tratamiento con lovastatina 5 μ M inhibe por completo la síntesis de colesterol y, lo que es más importante, evita la acumulación de intermediarios de la ruta del mevalonato cuando se combina con Fmev (**Figura 2**). Bajo estas premisas se llevó a cabo un estudio de la proliferación celular combinando ambos inhibidores y se comprobó que la lovastatina, que por sí sola parece afectar la proliferación de las HL-60, sin embargo previene, al menos parcialmente, la inhibición de la proliferación provocada por Fmev (**Figura 42.A**).

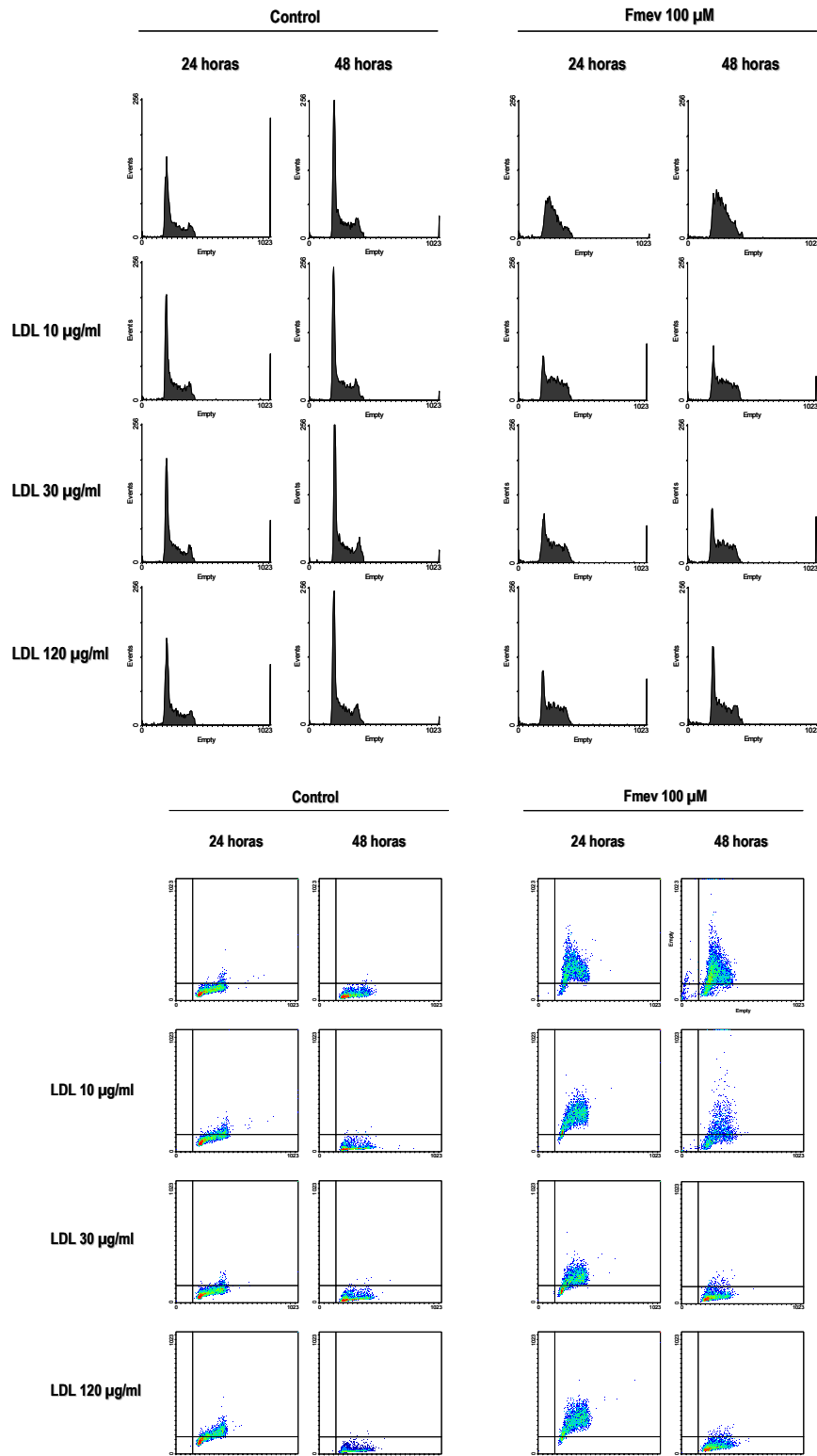


Figura 4.1. Efecto de la adición de colesterol LDL sobre de la distribución del ciclo celular y la presencia de daño en el ADN de células tratadas con fluoromevalonato. Las células HL-60 se incubaron durante 24 y 48 horas en ausencia (control) o presencia de dosis crecientes de LDL. Transcurrido ese tiempo se marcaron con el anticuerpo específico para γ -H2AX (diagramas de densidad de la parte inferior de la figura) y con yoduro de propidio para el análisis de la distribución del ciclo celular (histogramas de la parte superior). Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de 3.

El efecto fue más evidente a tiempos cortos, lo cual podría deberse a que las células acusan la deficiencia de colesterol provocada por ambos inhibidores cuando se prolonga el tratamiento. De hecho, la adición de LDL al medio mejoró la recuperación de la proliferación celular (**Figura 42.B**).

El estudio de la distribución del ciclo celular y la síntesis de ADN a las 24 horas de tratamiento confirmó los datos de proliferación, observándose una normalización tanto de la distribución del ciclo como de la incorporación de BrdU al combinar Fmev y lovastatina (**Figura 42.C**). Además, se analizó la presencia de dobles roturas en el ADN mediante el marcaje de γ -H2AX, comprobándose que la lovastatina evitaba el incremento del daño replicativo inducido por el Fmev. Por último, determinó el contenido de ATP en estas condiciones y se observó que la presencia de lovastatina prevenía el descenso de ATP producido por Fmev (**Figura 42.D**).

4.6.4. Estudio de la expresión del gen *HMGR*

Ante la imposibilidad de medir la concentración de mevalonato químico en las células y, por tanto, la actividad real de la HMG-CoA reductasa, nos planteamos medir la expresión del gen, *HMGR*, y comprobar si estaba afectada por el tratamiento con Fmev y el efecto de las LDL. Los resultados se compararon con los de la lovastatina, un inhibidor competitivo de la HMG-CoA reductasa que, mediante la disminución del contenido celular de colesterol, induce la expresión de *HMGR* y de otros genes modulados por SREBP-2 [198]. Para ello las células HL-60 se incubaron en presencia de Fmev o lovastatina en combinación o no con colesterol LDL 120 μ g/ml durante 24 horas. Las células se lisaron para la extracción del ARNm y la expresión del gen se estudió por RT-PCR. Además de *HMGR*, se incluyeron en el análisis los genes *MVD* y *LDLR*, el primero por ser el gen de la diana del inhibidor y el segundo porque es sabido que se incrementa cuando la síntesis endógena del colesterol disminuye.

Tal y como se esperaba, la lovastatina incrementó la expresión de los tres genes en estudio: *HMGR*, *MVD*, y *LDLR*, en correspondencia con la disminución del contenido intracelular de colesterol (**Figura 43**). El Fmev también activó la expresión de dichos genes, aunque menos pronunciadamente que la lovastatina. La adición de

LDL 120 $\mu\text{g/ml}$ reprimió la expresión de todos estos genes, especialmente cuando se añadió conjuntamente con lovastatina o Fmev.

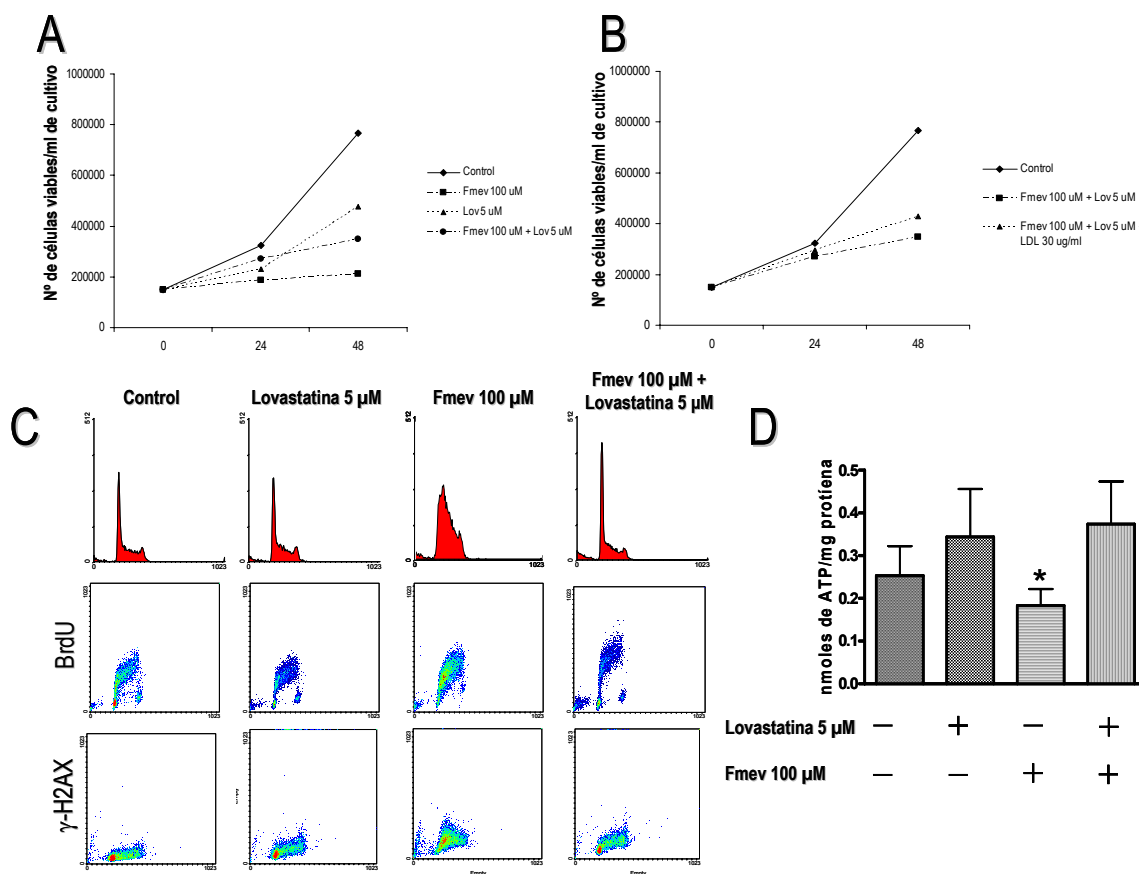


Figura 42. Efecto de la inhibición competitiva de la enzima HMG-CoA reductasa con lovastatina en células tratadas con fluoromevalonato. Las células HL-60 se trataron con Fmev 100 μM y/o lovastatina 5 μM . A. Se determinó el número de células viables por el método de exclusión de azul tripán en células incubadas inicialmente a una densidad de $1,8 \times 10^5$ células/ml. B. Por el mismo procedimiento se determinó el efecto de la adición de colesterol LDL 30 $\mu\text{g/ml}$. C. Las células se incubaron en las condiciones indicadas durante 24 horas y se analizó la distribución del ciclo celular, la incorporación de BrdU y el marcaje de la proteína γ -H2AX. D. En las condiciones anteriores se determinó el contenido de ATP. La gráfica muestra las medidas \pm EE de 3 experimentos representativos. Los efectos de los distintos tratamientos se analizaron por test ANOVA que fue significativo. A continuación se llevó a cabo el test de Tukey para comparaciones múltiples. * $P < 0,05$

Globalmente, estos resultados permiten sugerir que la reducción de la producción de mevalonato, consecuencia de la disminución de la actividad de la HMG-CoA reductasa bien por inhibición competitiva de la enzima (lovastatina) o por represión de su expresión (LDL), es la causa de la prevención del efecto del Fmev a cargo de dichos agentes.

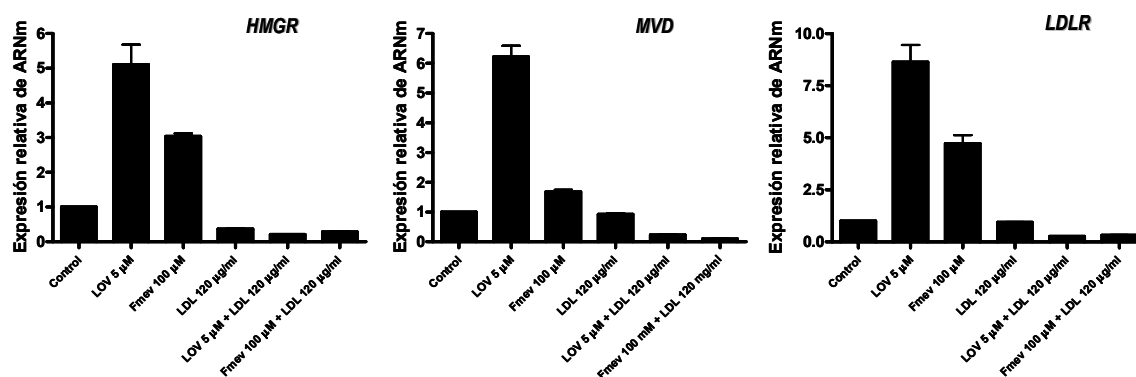


Figura 43. Efecto de la lovastatina, el Fmev y el colesterol LDL sobre la expresión de genes del metabolismo de lípidos. Las células HL-60 se incubaron durante 24 horas en presencia de Fmev 100 µM o lovastatina 5 µM solos o en combinación con colesterol LDL 120 µg/ml. Como control se emplearon células no tratadas. Se extrajo el ARN de las muestras y se analizó por RT-qPCR. El grado de expresión se normalizó respecto al de RPLP0 como control invariable. Las gráficas corresponden a un experimento representativo de tres. Para cada experimento, la expresión génica se midió por triplicado y los datos corresponden a la media±SD.

4.7 DEFICIENCIA DE DESOXIRRIBONUCLEÓTIDOS COMO CAUSA DEL ESTRÉS REPLICATIVO PROVOCADO POR FLUOROMEVALONATO

El estudio de la activación de la vía de AMPK mostró que el tratamiento con Fmev activaba dicha vía como resultado de la deficiencia de ATP que provocaba. Un descenso en los niveles de ATP puede provocar a su vez un desequilibrio en las concentraciones intracelulares de desoxirribonucleótidos [199] que, como han demostrado otros autores, puede dar lugar a un estrés replicativo similar al que observamos con Fmev [200]. Así, nuestro siguiente paso fue abastecer esos nucleótidos a las células y analizar si prevenían los efectos del Fmev sobre la proliferación. Las células no son capaces de captar nucleótidos, por lo que deben utilizarse desoxirribonucleósidos (dNs) como fuente de los mismos, los cuales son tomados por las células, fosforilados y utilizados para la síntesis de ADN [199]. En la **Figura 44** se muestran los resultados de dos primeros experimentos donde se examinaron los efectos de diferentes concentraciones (5, 10 y 20 µM) de una mezcla de desoxirribonucleósidos (dA, dG, dC y T) analizando la proliferación mediante conteo celular. Además, se empleó pentostatina (o desoxicoformicina), un inhibidor de la adenosina desaminasa (ADA), enzima responsable de la degradación de los nucleótidos [201], para analizar si la posible deficiencia de desoxirribonucleótidos era debida a una falta de producción o a una aumentada degradación.

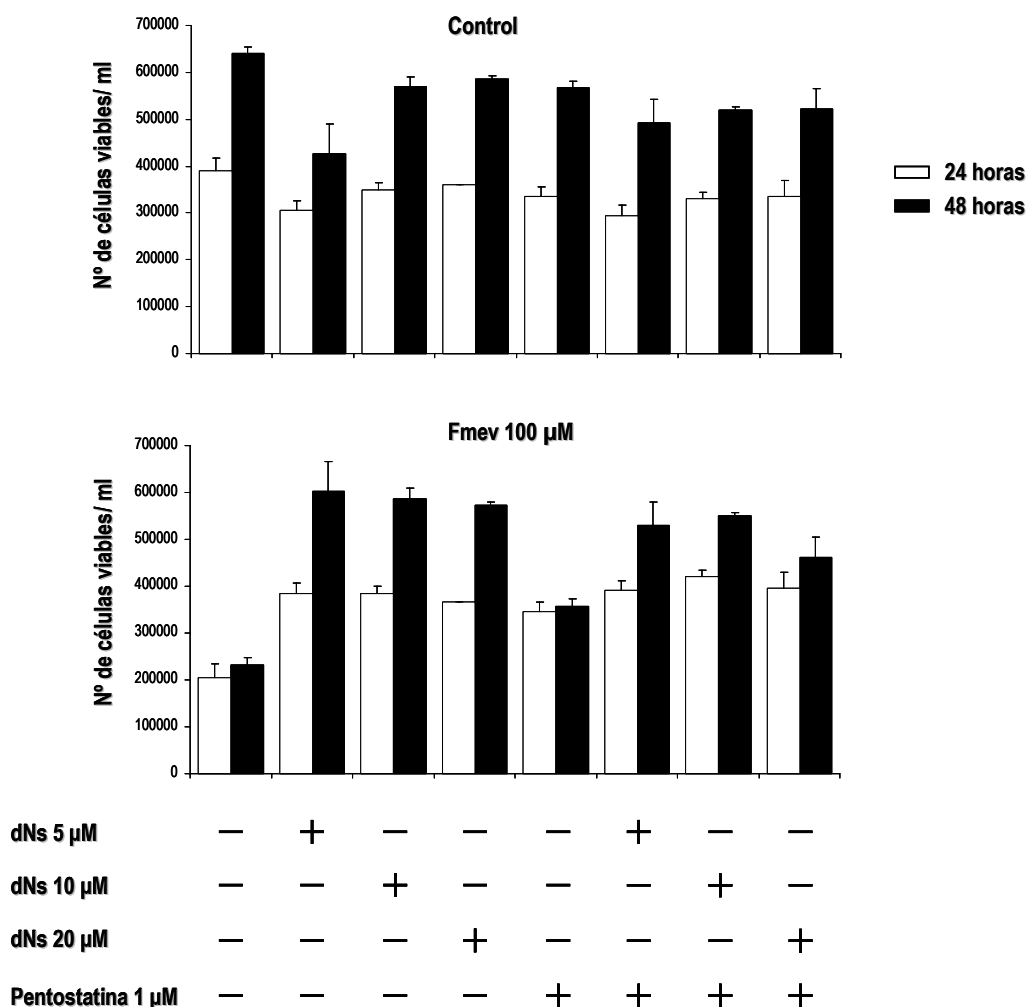


Figura 44. Estudio del efecto de la adición de dNs sobre la proliferación de células tratadas con fluoromevalonato. Se añadieron a los cultivos de células HL-60 incubadas a una densidad inicial de 1×10^5 células/ml, mezclas de desoxirribonucleósidos a las concentraciones indicadas. Todas ellas se trataron ocasionalmente con pentostatina $1 \mu\text{M}$. La gráfica superior muestra los efectos sobre células controles y la inferior, sobre células tratadas simultáneamente con Fmev $100 \mu\text{M}$. Ambas gráficas muestran las medias \pm DE de dos experimentos.

En la parte superior de la **Figura 44** se representan los resultados obtenidos en las células no tratadas con Fmev, es decir, controles. En ella se observa que, en conjunto, la adición de dN no afectó la tasa de proliferación, ni en ausencia ni en presencia de pentostatina $1 \mu\text{M}$. La pentostatina por sí sola tampoco afectó este parámetro

En la gráfica inferior de la **Figura 44** se muestran los resultados obtenidos en las células tratadas con Fmev $100 \mu\text{M}$. Como era de esperar, el Fmev inhibió la proliferación, manteniéndose el número de células a las 24 y a las 48 horas de cultivo a un nivel próximo al de partida (2×10^5 células/ml). La adición de dNs, en

cambio, previno dicha inhibición, permitiendo que el número de células creciera como en la condición control, incluso hasta las 48 h de incubación. La adición de pentostatina no mejoró el efecto de los dN. Interesantemente, la adición de pentostatina 1 μ M sola también mejoró la proliferación respecto a la condición de Fmev pero sólo en las primeras 24 h

A la vista de estos resultados se seleccionó la concentración de 10 μ M de la mezcla de dNs y se realizaron dos experimentos más para incrementar el poder estadístico de los datos de proliferación, así como para analizar la distribución del ciclo celular por citometría de flujo (**Figura 45**). Respecto al número de células, el análisis estadístico conjunto mediante ANOVA mostró que la adición de dNs incrementaba la proliferación en las células tratadas con Fmev (interacción significativa entre las variables dNs - 0 vs. 10 μ M - y tratamiento - C vs. Fmev), particularmente a las 48 h. En ese tiempo, la presencia de pentostatina no modificaba el efecto de los dNs. Sin embargo, en las primeras 24 horas de tratamiento, la presencia de pentostatina mejoraba la proliferación en las células tratadas con Fmev (interacción significativa entre las variables pentostatina - 0 vs. 1 μ M - y tratamiento - C vs. Fmev) (**Figura 45.A**).

El análisis de la distribución del ciclo celular por citometría de flujo confirmó los resultados obtenidos en los contajes del número de células viables. Como se muestra en la **Figura 45.B**, los dNs y la pentostatina no tuvieron efecto sobre la progresión del ciclo celular en células controles ni a las 24 ni a las 48 horas de tratamiento. El Fmev, por su parte, produjo la esperada parada en fase S con un ligero y lento avance a través de la misma a las 48 horas de tratamiento pero sin llegar a alcanzar la fase G2/M. La adición de dNs no tuvo efecto a las 24 horas, donde el mayor porcentaje de células se encuentra en fase S. A las 48 horas, en cambio, se aprecia una población en G2/M y un ligero incremento de las células en G1, lo que es indicativo de la progresión del ciclo celular y confirma los datos de proliferación. Lo contrario ocurrió con pentostatina, donde la población en G2/M se incrementó ligeramente a las 24 horas aunque no continuó incrementándose tras 48 horas de tratamiento.

La combinación de los 3 tratamientos permitió una recuperación de la distribución normal del ciclo a las 24 horas, pero a las 48 horas el ciclo se

desdibuja, lo cual parece indicar la presencia de diferentes poblaciones que avanzan a través del ciclo a ritmos distintos.

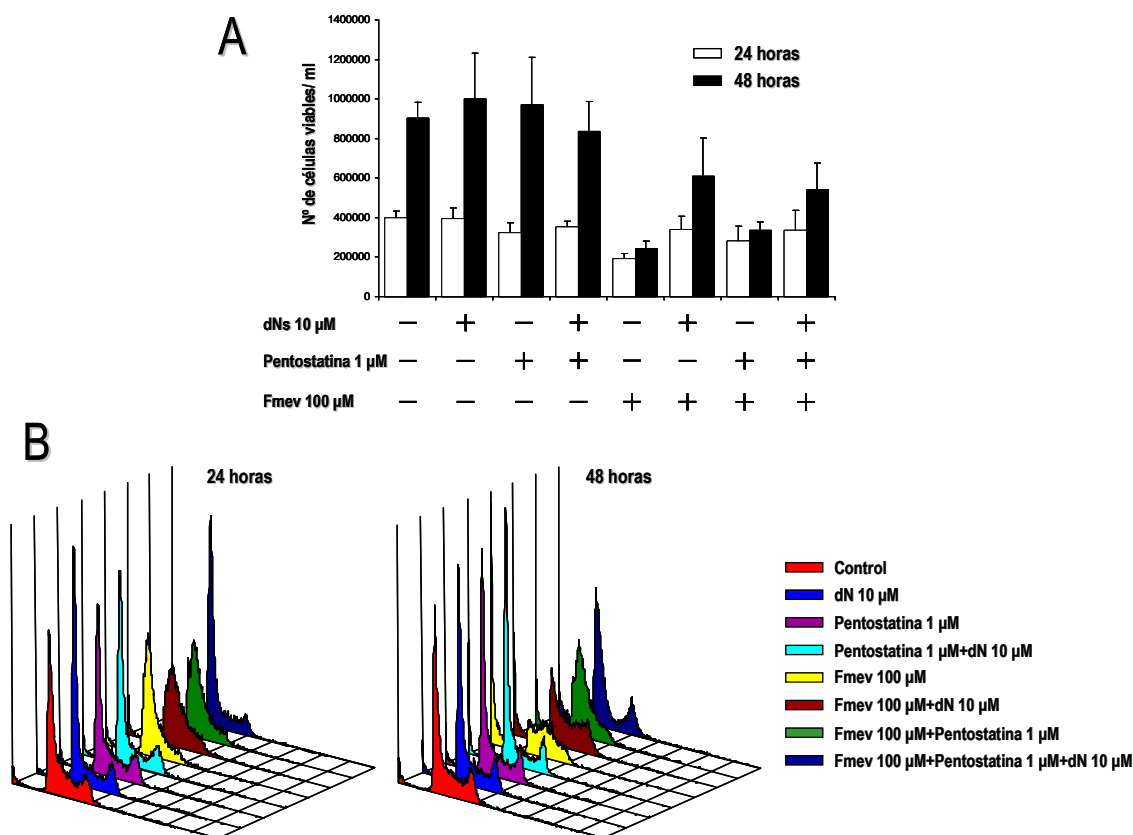


Figura 45. Efecto de la adición de dNs y pentostatina sobre la proliferación y la distribución del ciclo celular de células tratadas con fluoromevalonato. Las células HL-60 se incubaron a una densidad inicial de 2×10^5 células/ml y se trataron durante 24 y 48 horas en presencia de Fmev 100 μ M, una mezcla de dNs a una concentración de 10 μ M y pentostatina 1 μ M, todos ellos por separado y en diferentes combinaciones. Como control se emplearon células no tratadas. **A.** Se estudió la proliferación como el número de células viables determinadas por el método de exclusión de azul tripán (medias \pm DE). Los efectos de los distintos tratamientos se analizaron por test ANOVA de tres vías para el análisis de la interacción. En los casos en los que la interacción fue significativa se analizaron las diferencias por comparación de su intervalo de confianza. **B.** Se estudió la distribución del ciclo celular por marcaje del ADN con yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo.

En conjunto, estos resultados indican, en primer lugar, que las células tratadas con Fmev demandan desoxirribonucleótidos para proliferar con normalidad y, en segundo lugar, que la supuesta deficiencia de desoxirribonucleótidos no es consecuencia de una acelerada degradación de los mismos sino de la falta de producción. Así, evitando la degradación de los desoxirribonucleótidos disponibles

en las primeras horas de tratamiento con Fmev, se consigue que replique el ADN pero únicamente en un ciclo celular.

A lo largo de este trabajo hemos demostrado que el tratamiento con AICAR produce un efecto similar al del Fmev en cuanto a que provoca un estrés replicativo en las células HL-60 que da lugar a daño en el ADN y un retraso en el avance a través de la fase S con bloqueo de la incorporación de BrdU al ADN. Además también da lugar a una deficiencia de ATP por lo que nos planteamos estudiar si también en el caso de AICAR la adición de dNs al medio de cultivo permitía a las células proliferar y prevenía el bloqueo en fase S. Habiendo comprobado en el experimento anterior que la adición de dNs y pentostatina - de forma individual o en combinación - no provocaban efecto alguno sobre la proliferación o la distribución del ciclo celular, esta vez nos centramos en los efectos que tenían sobre las células tratadas con AICAR. Igual que hicieramos con Fmev las células se incubaron durante 24 y 48 horas en las condiciones indicadas y se tomaron muestras para el estudio del número de células viables y la distribución del ciclo celular. Comprobamos que la adición de dNs permitió la proliferación de las células tratadas con AICAR, tanto en ausencia como en presencia de pentostatina, alcanzándose un número de células en esos casos similar al de la condición control, a las 24 y a las 48 horas (**Figura 34**). Por otra parte, los dNs normalizaron el ciclo celular en las células tratadas con AICAR, lo que refuerza los datos de conteo de células. Estos efectos sobre el ciclo fueron más claros a las 24 horas de tratamiento, por cuanto a las 48 horas se apreció un incremento de la muerte celular en todas las condiciones tratadas con AICAR (**Figura 34**).

En resumen, hemos observado que los efectos del AICAR sobre la proliferación y la progresión del ciclo celular de las células HL-60 son equivalentes a los de Fmev. En ambos casos se produce una deficiencia de ATP que conduce a estrés replicativo probablemente a través de una deficiencia o desequilibrio de desoxirribonucleótidos. En respuesta a este estrés, la célula activa la vía de ATR-Chk1 que, en último término bloquea el avance a través de la fase S y, por tanto, la proliferación de las células.

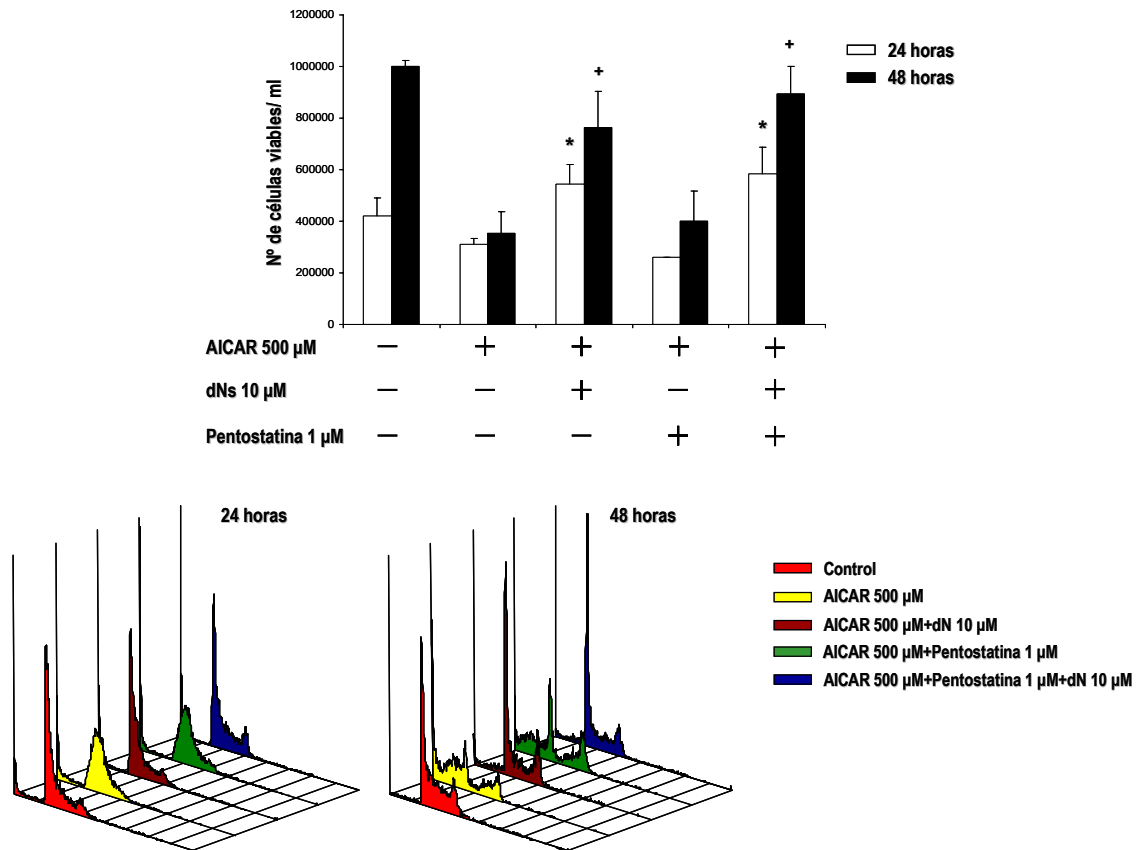


Figura 46. Efecto de la adición de dNs y pentostatina sobre la proliferación y la distribución del ciclo celular de células tratadas con AICAR. Las células HL-60 se incubaron a una densidad inicial de 2×10^5 células/ml y se trataron durante 24 y 48 horas en presencia de AICAR 500 μ M, una mezcla de dNs a una concentración de 10 μ M y pentostatina 1 μ M, todos ellos por separado y en diferentes combinaciones. Como control se emplearon células no tratadas. **A.** Se estudió la proliferación como el número de células viables determinadas por el método de exclusión de azul tripán (medias \pm DE). Los efectos de los distintos tratamientos se analizaron por test ANOVA que fue significativo. A continuación se analizaron por el test de Tukey para comparaciones múltiples. Los asteriscos muestran las condiciones que son diferentes significativamente respecto al tratamiento con AICAR a 24 horas (* $P < 0,05$) y las cruces respecto al tratamiento a 48 horas (+ $P < 0,05$) **B.** Se estudió la distribución del ciclo celular por marcaje del ADN con yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La implicación del colesterol en procesos fisiológicos de diversa índole ha conferido a esta molécula una gran importancia biológica. El papel del colesterol en la proliferación y la progresión del ciclo celular ha quedado demostrado en diferentes trabajos en los que se han empleado inhibidores de su ruta de biosíntesis, produciendo efectos que van desde el bloqueo del ciclo celular, impidiendo que las células comiencen la síntesis de ADN [144], a la inhibición de la división celular por mitosis [148]. En el caso de las estatinas (inhibidores de la enzima HMG-CoA reductasa), los efectos dependen de la concentración empleada y, por tanto, del grado de inhibición de la enzima [158]. Así, una alta dosis de lovastatina provoca un bloqueo del ciclo celular en la fase G1, mientras que bajas dosis del inhibidor llevan a una parada en G2/M [145]. Diferentes estudios demostraron que el primer efecto es debido a la deficiencia de mevalonato y sus derivados isoprenoides no esteroides [61, 161, 202, 203], mientras que la deficiencia de colesterol es la responsable de que las células no puedan completar la citocinesis [4, 147, 157]. Por tanto, no sólo el producto final- colesterol- es fundamental para la célula, sino que a lo largo de toda la ruta de biosíntesis se forman compuestos con un papel determinante en la fisiología celular.

El mevalonato es uno de los compuestos de gran relevancia para la célula. La llamada vía del mevalonato es la responsable de la síntesis de isopentenil difosfato a partir de mevalonato e implica la acción de tres quinasas: mevalonato quinasa (MK), fosfomevalonato quinasa (PMK) y mevalonato difosfato descarboxilasa (MVD). Derivados del isopentenil difosfato, aparte de los que conducen a la formación de esteroides, son esenciales para la célula como el farnesol, el geranilgeraniol, los dolicoles, la ubiquinona o la isopenteniladenina [29]. Parece por tanto razonable que la producción de isopentenil difosfato esté finamente controlada para satisfacer las necesidades de la célula de los isoprenoides no esteroides.

Los inhibidores de esta vía, entre los que se incluyen las ya mencionadas estatinas y los bisfosfonatos, se emplean en clínica para reducir la hipercolesterolemia en el primer caso, y para incrementar la densidad ósea en el tratamiento de la osteoporosis en el segundo, pero también se está considerando

su utilidad para combatir el cáncer por su capacidad de inhibir la proliferación celular [204]. Dentro de este grupo de compuestos se encuentra el 6-fluoromevalonato (Fmev), inhibidor de la MVD. Esta enzima juega un papel fundamental en la regulación de la síntesis de colesterol como ya estudiaran García- Peregrín y colaboradores en sus primeros trabajos en los años 80 [205-207].

Se ha demostrado que el Fmev suprime la proliferación de células en cultivo y, en consecuencia, es un potencial agente anticancerígeno [156, 160, 162]. Este compuesto también inhibe la síntesis de la hormona juvenil en insectos por cuanto deriva del isopentenil difosfato, habiendo sido utilizado como insecticida [208].

5.1 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN EXPERIMENTAL DE LA ENZIMA MEVALONATO DIFOSFATO DESCARBOXILASA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR

Para estudiar los efectos del Fmev sobre la biosíntesis de colesterol se utilizaron células de la línea promielocítica humana HL-60 incubadas en un medio de cultivo libre de colesterol, analizando la incorporación de [^{14}C]-acetato a los distintos intermediarios, tanto esteroides como no esteroides. Utilizando una columna de HPLC del tipo SAX, con especial afinidad para los compuestos fosforilados, observamos que el tratamiento con Fmev provocaba la acumulación de mevalonato difosfato (MVPP) y mevalonato fosfato (MVP) en este orden de magnitud. Estos picos desaparecían cuando las muestras eran tratadas con KOH para eliminar los grupos fosfato. A su vez, estas sustancias no se detectaban en las células tratadas con lovastatina o en las tratadas simultáneamente con Fmev y lovastatina. Estos resultados están de acuerdo con la acción del Fmev demostrada anteriormente por otros autores [22]. En las células tratadas con Fmev también se detectó la presencia de una cierta cantidad de isopentenil difosfato/dimetilalil difosfato (IPP/DMAPP) radiactivo, que sugería que la inhibición de la MVD no era total. De hecho, otros autores han observado en células HepG2 tratadas con Fmev 100 y 200 μM la presencia de IPP/DMAPP analizado mediante HPLC-MS [209]. El análisis de la incorporación de radiactividad a esteroides mostró una importante

inhibición de síntesis de colesterol (> 40%) pero que no era total ni tan siquiera cuando se incrementaba la dosis de Fmev hasta 500 μ M. En comparación, la lovastatina 5 μ M bloqueó totalmente la síntesis de colesterol. Por lo tanto, podemos afirmar que en nuestras condiciones experimentales el Fmev reduce la actividad de la MVD aunque no la inhibe por completo.

5.1.1. El fluoromevalonato inhibe la proliferación celular

Conocida la reducción de la tasa de biosíntesis de colesterol y la acumulación de compuestos intermediarios de la ruta se comprobó si estos efectos tenían alguna repercusión sobre la proliferación de las células. En sus primeros trabajos con Fmev, Cuthbert y Lipsky observaron diferentes respuestas en función de la línea celular empleada [156]. A pesar de que la metodología manejada por estos autores es algo diferente de la nuestra, ya que sus medios de cultivo se componían de un plasma pobre en lipoproteínas, lo que implica la presencia de trazas de colesterol, sus resultados nos permiten afirmar que las diferentes características de las distintas líneas celulares pueden modular la respuesta a Fmev. En nuestro caso, el medio empleado carece por completo de colesterol incrementando, de este modo, los efectos del Fmev. Mediante el seguimiento del número de células a lo largo de 72 h, comprobamos que el tratamiento con Fmev provocaba una inhibición de la proliferación, de acuerdo con lo publicado en otros trabajos [156, 160, 210]. Para determinar si esta era una respuesta universal, se utilizaron diferentes líneas celulares y se confirmó que había diferentes respuestas en cuanto a proliferación. Las células leucémicas de la línea Molt-4 sufrieron una inhibición de la proliferación similar a la de las HL-60. En ambos casos, el número de células se estanca ya en las primeras 24 horas de tratamiento incluso con la dosis más baja de Fmev. Las células de hepatocarcinoma- Hep-G2- o las de neuroblastoma- SH-SY5Y- requirieron más tiempo de tratamiento y una mayor dosis para que se observara un efecto, mientras que las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF7 apenas respondieron al tratamiento con Fmev. Las causas no son evidentes, sin embargo, hay que señalar que las células que mostraron una mayor respuesta son aquellas que presentan una mayor tasa de proliferación, por lo que son

susceptibles de responder más rápido a cualquier agente que inhiba la proliferación.

Resulta interesante mencionar que las dos líneas de cáncer de mama presentan diferente dotación para p53. Así las MCF7 tienen un fenotipo normal y las MDA-MB-231 tienen un fenotipo mutado. Freed-Pastor y colaboradores han apuntado recientemente a una relación entre la dotación de p53 y la vía del mevalonato [211]. Estos autores muestran que las células que expresan mutaciones sin sentido de p53 frecuentemente detectadas en tumores humanos, tienen un crecimiento desordenado, que se relaciona con un incremento de la transcripción de los genes de la vía de la síntesis de colesterol y concluyen que la p53 mutada interactúa con SREBP, incrementando la transcripción de dichos genes. A pesar de que nuestros resultados no parecen indicar que la dotación de p53 sea clave en los efectos observados, no podemos descartar, a la vista de ese trabajo, que el fenotipo de p53 nula que presentan las células HL-60 esté, de algún modo, potenciando los efectos del Fmev. Por otro lado, conviene mencionar que, en este mismo trabajo, se asigna el efecto del Fmev a la deficiencia de isoprenoides que provocaría la inhibición de la enzima MVD, por cuanto son capaces de revertir los efectos por adición de GGPP a los cultivos. Como ya se ha comentado, en nuestro caso el tratamiento con Fmev no bloqueó la enzima - como lo demuestran la presencia de IPP y colesterol - por lo que no parece que una deficiencia de isoprenos sea la causa de la inhibición de la proliferación observada. No obstante, estos autores emplearon altas dosis de Fmev y hasta 8 días de tratamiento, lo que podría explicar la carencia de isoprenoides no esteroides esenciales. Estos datos, así como los obtenidos años antes por Cuthbert y Lipsky nos hacen reconocer que los efectos del Fmev pueden variar en función de la línea celular, la concentración empleada, la composición del medio y el tiempo de seguimiento. Nuestro interés se centró en el estudio de los efectos de dosis relativamente bajas de Fmev y a tiempos cortos, por su mayor relevancia. La elección de la línea HL-60 se basa en su carácter de célula leucémica humana prototípica, de tipo promielocítico, que tiene la peculiaridad (aunque no es exclusiva) de no detenerse en G1 cuando se les hace deficientes de colesterol - como hacen la mayoría de tipos celulares - sino que prosiguen a través de S para detenerse finalmente en G2/M, lo cual permite

estudiar las acciones del colesterol (y de otros metabolitos) en estas últimas fases del ciclo.

Para comprobar si el efecto del Fmev era citotóxico para las células HL-60 se llevó a cabo un estudio del número de células viables. Los resultados mostraron que, si bien no hay incremento del número de células en presencia de Fmev, tampoco hay descenso apreciable, por lo que el Fmev estaría ejerciendo un efecto citostático más que citotóxico.

El siguiente paso consistió en caracterizar este efecto. Para ello se analizó el ciclo celular, donde se observó que el tratamiento con Fmev produce un retraso del ciclo celular con acumulación de células en la fase S, acompañada con una disminución de la tasa de síntesis de ADN en fase S tardía. Esto indica una inhibición de la replicación del ADN. El análisis a distintos tiempos determinó que, progresivamente, las células se van acumulando en fase S y desaparece la población de células en G2/M. Así se puede concluir que el efecto citostático observado es el resultado de una parada del ciclo celular en la fase S, es decir, de la alteración de la replicación del ADN.

En nuestro laboratorio se han llevado a cabo diversos estudios en torno a la relación entre la biosíntesis de colesterol y la progresión del ciclo celular. Así, el empleo de inhibidores distales de la ruta permitió demostrar que la carencia de colesterol en células HL-60 y MOLT-4, conduce a un bloqueo del ciclo celular en la fase G2/M [4, 142, 145-148]. Además de su papel como componente fundamental de las membranas celulares, que lo hace necesario para que pueda llevarse a cabo la citocinesis [83, 84], el colesterol ejerce acciones a nivel molecular indispensables para un correcto desarrollo del ciclo. Así, induce la expresión de ciclina B1 y la activación de Cdk1 que permiten la transición de G2 a mitosis [4, 142]. Por otro lado, como ya se ha mencionado mas arriba, altas dosis de lovastatina y otros inhibidores de la enzima HMG-CoA reductasa, provocan un bloqueo del ciclo celular en G1- inhibiendo la síntesis de ADN - como resultado de la deficiencia de isoprenos esenciales generada [145]. Por tanto, la singularidad de la parada en fase S producida por la inhibición de MVD con Fmev, nos indujo a estudiar los mecanismos subyacentes por cuanto debían ser distintos de los conocidos hasta la fecha por acción de otros inhibidores de la ruta de la colesterogénesis.

La siguiente pregunta que nos planteamos fue si el efecto de Fmev era reversible. Para comprobarlo las células HL-60 se trataron con Fmev y este se eliminó del medio de cultivo tras 15 horas de incubación. Las células fueron capaces de recuperar una distribución del ciclo celular similar a la observada en la condición control aunque necesitaban al menos 24 horas para ello. Estos datos sugieren que el efecto citostático del Fmev deriva de la alteración del metabolismo que produce, la cual es reversible.

5.1.2. Los efectos de fluoromevalonato son dependientes de la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa

Las células HL-60, al igual que otras células tumorales, presentan una alta actividad de la enzima HMG-CoA reductasa y, por tanto, una elevada tasa de síntesis de mevalonato [212]. Como se ha apuntado anteriormente, es posible que la marcada respuesta de las células HL-60 al tratamiento con Fmev - en lo que se refiere a inhibición de la proliferación - esté relacionada con esta alta actividad de HMG-CoA reductasa. En sus pioneros trabajos, Cuthbert y Lipsky ya plantearon que el efecto del Fmev podría ser resultado de la acumulación de algún derivado del mevalonato que ejerciera un efecto negativo sobre la proliferación celular [162]. A fin de determinar los efectos de la acumulación de mevalonato fosfato sobre las células HL-60 nuestros siguientes estudios se encaminaron a determinar si la inhibición de la HMG-CoA reductasa prevenía los efectos del Fmev en la proliferación y síntesis de ADN. Cuthbert y Lipsky [162] mostraron que la lovastatina prevenía la inhibición de la proliferación ejercida por Fmev. Nosotros comprobamos dichos resultados, observando que efectivamente la inhibición de HMG-CoA reductasa con pequeñas dosis de lovastatina - pero suficientes como para inhibir la síntesis de colesterol, como así se determinó por HPLC - prevenía, al menos temporalmente y en parte, el efecto del Fmev sobre la proliferación. No solo eso sino que la sola presencia de lovastatina fue suficiente también para restituir un ciclo celular normal y la síntesis de ADN en las células expuestas a Fmev. Hay que recalcar que el efecto preventivo de las estatinas es temporal, ya que si se perpetua en el tiempo la inhibición de la HMG-CoA reductasa, la

deficiencias de isoprenoides no esteroides y de colesterol ocasionadas impedirían la proliferación celular[61, 161, 202, 203].

También estudiamos los efectos de la adición de LDL al medio. A concentraciones bajas, las LDL no modificaron el efecto del Fmev, sin embargo sí evitaron los efectos de la lovastatina. Estos resultados descartaban que los efectos provocados por el Fmev fueran el resultado de una deficiencia de colesterol. A dosis más altas y prolongando el tiempo de incubación, sin embargo, las LDL conseguían prevenir los efectos del Fmev. Hay que señalar que las células tratadas con Fmev utilizan las LDL a una tasa equivalente a las tratadas con lovastatina [213]. Por lo tanto, no parecía que las células tratadas con Fmev requirieran una fuente exógena de colesterol para la formación de membranas. En este mismo sentido, las células tratadas con Fmev no manifiestan deficiencia de isoprenoides no esteroides, por cuanto la adición de farnesol o geranylgeraniol al medio de cultivo fue totalmente ineficaz.

Es conocido que la enzima HMG-CoA reductasa está regulada a nivel de la transcripción por el contenido intracelular de colesterol [30]. En nuestras condiciones experimentales hemos comprobado que ambos inhibidores de la colesterogénesis estimulan la expresión de genes regulados por SREBP, como *HMGR*, *LDLR* o *MVD*, aunque el Fmev lo hace en menor grado que la lovastatina a las dosis empleadas. El efecto del Fmev, aunque previsible, no se había demostrado anteriormente. Así mismo, la adición de LDL al medio de cultivo reprimió la expresión de dichos genes, tanto en ausencia como en presencia de los mencionados inhibidores de la síntesis de colesterol. Estos resultados permiten proponer que el efecto protector de las LDL en las células tratadas con Fmev, semejante al de la lovastatina, se debe a la represión de la HMG-CoA reductasa. La lovastatina es un fuerte inhibidor competitivo de dicha enzima. En ambos casos, la menor actividad de la enzima es previsible conduzca a una menor síntesis de mevalonato. Estos resultados sostenían la hipótesis ya planteada al principio de que la inhibición de la proliferación provocada por Fmev estaba relacionada con la acumulación de mevalonato o alguno de sus derivados. Siendo así, la adición de este compuesto a células tratadas con el inhibidor de MVD debía potenciar su efecto. De acuerdo con esto el mevalonato, que no tuvo efecto alguno sobre la

proliferación o el ciclo celular de las células control, sí incrementó los efectos del Fmev, aumentando la muerte celular.

Así pues, el efecto del Fmev podría estar mediado por la acumulación de algún derivado no determinado del mevalonato - como propusieran Cuthbert y Lipsky [162]- pero ni el análisis mediante HPLC de los ácidos orgánicos sintetizados a partir de ^{14}C -acetato realizado por nosotros, ni el estudio de Henneman y col. mediante HPLC-MS [209] aportaban ninguna pista sobre dicha posibilidad. Existe la alternativa de que no sea la formación de ningún derivado del mevalonato, sino la propia fosforilación del mevalonato y la imposibilidad de su ulterior metabolización, la causa del daño para la célula, como se comentará más adelante.

Estos datos nos permiten también proponer que las diferentes respuestas de las distintas líneas celulares al Fmev puedan estar relacionadas con el nivel de actividad de HMG-CoA reductasa que presenten. Conviene recordar también, que las líneas tumorales con mayor tasa de proliferación son las que mayor actividad de la enzima presentan [214-216], por lo que la acumulación de mevalonato producto de la inhibición de la MVD debe ser mayor en estos casos.

5.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LOS EFECTOS DE FLUOROMEVALONATO SOBRE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR

5.2.1. Las vías de señalización de las MAPKs no están implicadas en la parada en fase S provocada por fluoromevalonato.

Una vez caracterizados los efectos del Fmev sobre la progresión del ciclo celular el objetivo del trabajo se centró en la descripción del mecanismo que conducía a estos efectos. Para ello estudiamos diferentes vías de señalización implicadas en la regulación del ciclo celular. Debido a la gran variedad de estímulos que reciben y respuestas que provocan las MAPKs y su demostrado papel tanto en la progresión normal del ciclo celular como en la activación de puntos de control en respuesta a estrés, esta familia de serín-treonina quinasas fueron las primeras en ser estudiadas.

En primer lugar se estudió si el tratamiento con Fmev producía una activación de la proteína p38 MAPK. En nuestro laboratorio habíamos demostrado

que la deficiencia de colesterol provocada por el tratamiento con SKF 104976- un inhibidor de la enzima 14 α -desmetilasa- inducía la activación de p38 MAPK en las células en G2/M, lo cual contribuía a que las células no reiniciaran la síntesis de ADN [189]. Por tanto, parece que la deficiencia de colesterol es interpretada por la célula como un estrés que dispara esta vía de señalización. El estudio por *western blot* de la activación de la proteína no mostró cambios significativos de su forma activa en los tiempos en los que se observaba la acumulación de las células en S. Para confirmar este dato se ensayó si el tratamiento con SB 203580, compuesto descrito como inhibidor de la actividad de p38 MAPK [217], prevenía el efecto del Fmev en células sincronizadas en G1. En las células incubadas en ausencia de Fmev, el SB 203580 aceleró la entrada en la fase S, lo que coincide con el papel de punto de control atribuido a p38 MAPK [140, 189]. En las células tratadas con Fmev, la adición del inhibidor de p38 MAPK aceleró igualmente la entrada en S. Sin embargo, la acumulación de las células en la fase S, propia de la acción del Fmev, no se vio afectada por SB 203580. En conjunto, los resultados demuestran que p38 MAPK no está implicada en la parada en fase S provocada por Fmev.

La siguiente MAPK estudiada fue JNK. Diferentes estudios han demostrado que la isoforma JNK1 está implicada en la parada del ciclo celular inducida por estrés mientras que JNK2 es necesaria para la citocinesis [125, 218, 219]. Otros autores han descrito que JNK se mantiene activa desde la fase S temprana hasta anafase tardía y que participa en la parada en S inducida por la inhibición del proteasoma [219]. Con esos antecedentes nos planteamos determinar si JNK tenía algún papel en la parada en fase S provocada por Fmev. En primer lugar se estudió la expresión de la proteína por *western blot* a tiempos cortos de tratamiento con Fmev. Los resultados mostraron que la forma fosforilada (activa) de la proteína se incrementaba ligeramente a partir de las 6 horas coincidiendo con el tiempo de tratamiento en el que comienzan a acumularse células en S, sin embargo las diferencias con el control no fueron estadísticamente significativas. A continuación se estudió el efecto de SP 600125, un inhibidor de JNK [220], en células sincronizadas en G1, como en el experimento anterior. En comparación con la condición control, la adición de SP 600125 permitió el avance normal a través de la fase S pero provocó la acumulación de las células en G2/M, lo cual está de acuerdo con el requerimiento de JNK para la mitosis [221]. Cuando se añadió en

combinación con Fmev, las células permanecieron paradas en S sin llegar a G2/M, lo cual descarta la participación de la vía de señalización de JNK en el efecto de Fmev.

La última de las MAPK estudiada fue la vía de ERK 1/2. ERK 1 y 2 son dos isoformas de 44 y 42 kD respectivamente cuya función es indispensable en el ciclo celular participando prácticamente en todas las etapas del mismo [119, 120, 222]. El papel de ERK en mitosis presenta cierta controversia en la literatura. Mientras que algunos autores observan que la inhibición de ERK 1/2 en G2 reduce el número de células que entran en mitosis o, si es en metafase/anafase o en telofase impide la abscisión celular [222], otros aseguran que ERK 1/2 no es necesaria para la entrada y salida de las células de mitosis, aunque si es fundamental para el comienzo de G2 [223]. El papel de ERK en la entrada en S parece más claro ya que el empleo del inhibidor de la quinasa, PD 98059, desde G2/M impide que las células transiten de G1 a S [117]. Aunque su papel en la progresión a través de la fase S no ha quedado demostrado, nos pareció interesante estudiar su participación como mediador de los efectos de Fmev sobre el ciclo celular.

Análogamente a las MAPK anteriores, no encontramos diferencias significativas en los distintos tiempos de tratamiento entre las células tratadas con Fmev y las controles. Para estudiar los efectos de la inhibición de ERK 1/2 con PD 98059, el diseño del experimento cambió respecto a los anteriores ya que en las células que proliferan libremente, ERK 1/2 se activa en G2/M para actuar en el tránsito de G1 a S [117]. Por este motivo, una vez se liberaron las células del efecto de nocodazol se dejaron ciclar durante una hora y se añadió Fmev. En estas condiciones de incubaron 11 horas mas para permitir que todas las células (tratadas y controles) entraran en fase S. Fue entonces cuando se añadió PD 98059. Como ocurriera anteriormente con los inhibidores de las otras MAPK la inhibición de ERK 1/2 con PD 98059 no previno el bloqueo en fase S provocado por Fmev, descartando también la participación de esta vía en el proceso.

5.2.2. El tratamiento con Fmev produce un estrés replicativo que activa la vía de daño en ADN. Implicación de la vía de ATR-Chk1 en la inhibición del avance a través de S.

Lo interesante de los resultados obtenidos con Fmev es que la síntesis de ADN no se inhibe desde su inicio sino que esta comienza pero se enlentece su progresión. Un retraso en el avance a través de S suele ser el resultado de algún tipo de estrés replicativo, por lo que nos propusimos estudiar el efecto que el tratamiento con Fmev tenía sobre este proceso. Primero estudiamos la presencia de daño en el ADN. Para ello se analizó la forma fosforilada de la proteína H2AX (γ -H2AX) descrita como marcador de dobles roturas del ADN (DSBs- *double strand breaks*) [112]. Mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo se demostró que un 60 % de las células tratadas con Fmev eran positivas para este marcaje, frente al 4% de las controles. Esto indica que la acumulación de mevalonato fosfato o alguno de sus derivados podría, de forma directa o indirecta, generar un daño en el ADN o bien afectar a la maquinaria de replicación dando como resultado la formación de DSBs. Además, el análisis combinado del contenido de ADN y la proteína γ -H2AX por citometría de flujo mostró que las células que acumulaban daño eran aquellas que se encontraban al inicio de S. El conjunto de estos resultados permite afirmar que el tratamiento con Fmev no afecta la entrada en la fase S del ciclo celular y que es a lo largo del proceso de replicación cuando se generan dobles roturas que llevarían a la célula al bloqueo que impide que las células alcancen G2/M. Por otro lado, los resultados obtenidos al combinar Fmev con lovastatina nos permiten afirmar que el daño en ADN no está causado directamente por el propio Fmev - como hacen compuestos como la hidroxiurea o la mitomicina C [224] - ya que la estatina previene el bloqueo en fase S y el incremento de γ -H2AX a pesar de que el Fmev continúe presente en el medio de cultivo (**Figura 30**). Por lo tanto, el daño en el ADN provocado por el Fmev es consecuencia de los efectos metabólicos de ese inhibidor.

Para determinar si este efecto era exclusivo del Fmev o se reproducía para otros inhibidores de la MVD, tratamos las células con fenilacetato descrito como inhibidor de aquella enzima. Comprobamos que, igual que el tratamiento con Fmev, el fenilacetato provocaba un retraso en el avance a través de la fase S, con

inhibición de la incorporación de BdrU al ADN e incremento del marcaje de γ -H2AX lo que indicaba presencia de daño en ADN.

La presencia de focos de γ -H2AX sugería que la parada en fase S observada debía de estar mediada por alguna de las vías de daño en ADN. En mamíferos, las señales que se activan cuando se produce este tipo de daño se transducen rápidamente a las quinasas ATM y ATR, proteínas de la familia de las fosfoinositol 3-quinasas (PIKKs) [91] de las que H2AX es diana. Por tanto, decidimos estudiar si por efecto del tratamiento con Fmev se estaban activando una o ambas vías. Los resultados mostraron que la forma fosforilada (activa) de ambas proteínas se incrementaba por efecto del tratamiento aunque la vía de ATM lo hacía de forma tardía. La activación de ATM/ATR conduce a la fosforilación de una gran cantidad de sustratos entre los que destacan las proteínas Chk1 y Chk2 [91]. La proteína Chk1 se fosforila fundamentalmente en dos residuos- S317 y S345- y la fosforilación de uno, otro o ambos, parece regular la función de Chk1. El tratamiento con Fmev provocó la fosforilación en ambos residuos con un pico máximo a las 9 horas de tratamiento, pero mientras que la fosforilación en S345 apenas se da durante las primeras horas, la fosforilación en S317 es más progresiva y ya se observa desde las primeras 3 horas. Estos datos concuerdan con los publicados por Niida y colaboradores que demuestran que la fosforilación en S317 sería la responsable de la activación del punto de control en S y que dicha fosforilación precede a la de S345, lo cual es necesario para el bloqueo del ciclo celular [103]. En cuanto a Chk2 su activación se dio de forma posterior a la de Chk1. Parece ser, que ante determinado tipo de daño, la proteína Chk1 activaría el punto de control y Chk2 tendría la función de mantenerlo [95] como así parece en nuestro caso.

Por tanto, ambas vías se activan por efecto del tratamiento con Fmev, aunque la vía de ATM-Chk2 parece tener un papel más secundario. A fin de confirmar este dato procedimos a la inhibición de estas vías y comprobar si se prevenían los efectos del Fmev sobre la progresión del ciclo celular. Para ello se emplearon los compuestos NU 6027, que se ha descrito recientemente como inhibidor de la vía de ATR [225] y KU 55933 como inhibidor de ATM [226]. Observamos que, mientras que la inhibición de ATM no tuvo efectos detectables sobre la parada en fase S ni sobre el incremento del marcaje de γ -H2AX, el

tratamiento con NU6027 redujo intensamente la fosforilación de H2AX especialmente en las células en S. No obstante, las células no progresaron a G2/M sino que, más bien, un porcentaje de células se detenían en G1 y otras aparecieron en subG1.

Hasta aquí los datos sugieren que la señalización por el tratamiento con Fmev transcurre por la vía de ATR-Chk1. Aunque de forma general se ha asignado a ATM el papel de la respuesta a DSBs [227] parece que la naturaleza del daño es la que determina la vía activada. Así, se ha observado que la histona se fosforila de manera dependiente de ATR en respuesta al estrés replicativo [116]. Por tanto el tratamiento con Fmev podría estar generando un estrés replicativo que llevaría a la activación de ATR y esta, a su vez, a la fosforilación de H2AX que, sin embargo, no sería la responsable última del bloqueo del ciclo celular como lo demuestra el hecho de que las células tratadas con Fmev y NU 6027 no avancen a través de S (**Figura 12**). Probablemente, el papel de γ -H2AX sería el de atraer los factores de reparación hacia el lugar del daño [114], aspecto que no ha sido abordado en el presente trabajo.

Tras comprobar que γ -H2AX no era la responsable última del bloqueo, nuestros estudios se centraron en el papel de Chk1. En primer lugar se llevó a cabo un silenciamiento de Chk1 empleando un siRNA específico de la proteína. Un análisis de la progresión del ciclo celular en células transfectadas, tratadas con Fmev, mostró un bloqueo del mismo en la fase G1. Estas células presentaban un incremento en el contenido de p21, lo que permite atribuir su parada en G1 a este inhibidor de quinasas. Otros autores describieron que la inhibición de Chk1 en células sometidas a algún tipo de estrés replicativo activaba p21 para detener la entrada en S [193]. El bloqueo en G1 nos impidió comprobar en este modelo los efectos de Fmev sobre la fase S.

Como alternativa empleamos el compuesto UCN01, descrito como un inhibidor específico de Chk1 [192]. Diferentes trabajos han demostrado que la inhibición de Chk1 con UCN01 en células sometidas a estrés replicativo por IR activa la entrada prematura en mitosis mediante la activación de la fosfatasa Cdc25A. Esto indicaría que el papel de Chk1 en el bloqueo del ciclo celular se daría, en último término, por una regulación negativa de la fosfatasa. De hecho, esta regulación negativa de Cdc25A - por activación de Chk1 - es esencial para el

retraso del ciclo celular cuando existen DSBs en el ADN [228]. La regulación de la Cdc25 implica su fosforilación en diferentes residuos, como la S75, aunque no parece que esta fosforilación sea suficiente para activar este punto de control [191]. Independientemente del residuo (o los residuos) fosforilados, es la degradación de la fosfatasa la que finalmente detiene el avance a través del ciclo, ya que la fosforilación promueve su degradación [228]. Basándonos en este concepto, decidimos analizar los cambios en los niveles de Cdc25A en células sincronizadas y comprobamos que, en efecto, en las células sincronizadas tratadas con Fmev la cantidad total de proteína disminuía respecto de aquellas también sincronizadas en fase S pero no tratadas (control). Por el contrario, la inhibición de Chk1 provocaría un incremento de los niveles de Cdc25A que se traduciría en una aceleración de la entrada en mitosis. Con esa idea, se trataron las células HL-60 con UCN01 y se estudió la histona H3 como marcador de mitosis. Comprobamos como la inhibición de Chk1 con UCN01 en células controles produjo, durante la primera hora de tratamiento, un incremento del porcentaje de células en mitosis, identificadas por la expresión de la forma fosforilada de la histona H3 (**Figura 15**). Este dato confirma la aceleración de la entrada en mitosis cuando Chk1 se inhibe. A tiempos más largos, el porcentaje de células en mitosis se redujo coincidiendo con el incremento de la muerte celular, lo que probablemente se debe a la toxicidad del compuesto.

En cuanto al Fmev, y de acuerdo con los resultados previos, produjo una disminución casi total del porcentaje de células en mitosis. La adición de UCN01 incrementó dicho porcentaje hasta niveles similares a los del control, especialmente durante la primera hora de tratamiento con el inhibidor de UCN01. Estos resultados apuntaban a Chk1 como responsable del bloqueo en fase S y mostraban que su inhibición provocaba una entrada prematura en mitosis. Los siguientes experimentos fueron encaminados a reforzar este dato. Hasta aquí habíamos empleado cultivos asincrónicos de células HL-60. A la vista de los resultados previos, todo parecía indicar que la inhibición de la vía de ATR-Chk1 en células sincronizadas, tratadas con Fmev, permitiría la progresión de las mismas a mitosis. De forma general para la sincronización de cultivos en G1 se emplea el doble bloqueo con timidina. Sin embargo, este tipo de tratamiento es, en si mismo, un activador de la vía de ATR [229]. Como alternativa, para evitar posibles

artefactos, para sincronizar las células empleamos un inhibidor de microtúbulos, el nocodazol, que detiene a las células en G2/M y no parece tener efecto alguno sobre las vías de daño en ADN. Observamos que la inhibición de Chk1 con UCN01 en células sincronizadas y tratadas posteriormente con Fmev, no permitía la progresión de las células a mitosis, contrariamente a lo que esperábamos en función de los resultados con células asincrónicas. Es posible que el momento de inhibición de la Chk1 sea determinante en el avance a mitosis, lo que explicaría que en cultivos heterogéneos (no sincronizados) un porcentaje pequeño pero significativo de células, seguramente las más próximas a completar la replicación del ADN, pudieran alcanzar mitosis tras la inhibición de la Chk1. Esto no ocurriría en el diseño experimental con células sincrónicas, donde el UCN01 se adicionó al comienzo de la fase S. La inhibición de ATR con NU 6027 en estas condiciones tampoco permitió el avance de las células a G2/M.

Como ya se ha mencionado, la inhibición de Chk1 provoca una entrada prematura en mitosis. Se ha demostrado además, que en células sometidas a algún tipo de estrés genotóxico, la inhibición de Chk1 con UCN01 conduce a una condensación prematura de la cromatina que culmina en catástrofe mitótica [194]. Conviene señalar que la simple inhibición de la Chk1 no asegura que la replicación del ADN se complete adecuadamente, por lo tanto, en caso de existir un defecto en la replicación del ADN, la liberación de este punto de control permitiría que se produjeran ciertos eventos del ciclo pero la célula seguiría teniendo un contenido de ADN menor de lo normal.

La entrada en mitosis en cualquier caso implica el incremento de ciclina B1, lo que la convierte en un eficaz biomarcador de la inhibición de Chk1 en esta situación. Por ello decidimos comprobar si la inhibición de Chk1, directamente o a través de la inhibición de ATR, en las células sincronizadas en S y tratadas con Fmev aceleraba la llegada a mitosis. Lo primero que pudimos comprobar es que la inhibición de la vía de ATR, en células controles - no sometidas al efecto de Fmev - ya provocaba un incremento de la expresión de ciclina B1 en células aparentemente en fase S, que no se observaba en las células control. Dicho incremento era transitorio en el caso de la inhibición de ATR y más persistente cuando se inhibía Chk1 con UCN01. En las células tratadas con Fmev, los efectos de la adición de los inhibidores de Chk1 fueron cuantitativamente algo distintos

que en las células controles: NU 6027 produjo un incremento de las células positivas para ciclina B1 a las 15 h de la liberación de nocodazol, y UCN01 sólo produjo un pequeño aumento a las 13 horas. Las causas de este desfase con respecto a las células controles no son evidentes. Existe la posibilidad de que en las células tratadas con Fmev, el daño en el ADN presente en combinación con la inhibición de la Chk1 acelere la muerte celular y, por lo tanto, impida visualizar el incremento de la expresión de la ciclina B.

En cualquier caso, hemos comprobado que la inhibición de ATR o Chk1 con NU 6027 y UCN01 respectivamente se traduce en un incremento extemporáneo de ciclina B1, incrementándose el porcentaje de células en fase S que expresan dicha ciclina y también en G2/M, en comparación con las células no tratadas con los inhibidores. En la condición control, sin Fmev, las células parecen alcanzar G2/M con normalidad, es decir, completan la replicación del ADN. En las células tratadas con Fmev, el incremento de la expresión de ciclina B no se corresponde con un avance en el contenido de ADN, y se produce una mayor muerte celular. Aunque se aparta del objetivo principal de este trabajo, estos resultados plantean la pregunta de cuál es el mecanismo que determina un incremento de la expresión de ciclina B1 tras inhibición de la Chk1. De forma muy resumida, el gen de la ciclina B1 comienza a expresarse a mediados de S y la concentración de la proteína alcanza su máximo al final de G2 [230], recayendo la regulación de la transcripción básicamente sobre una región del ADN conocida como CHR (*cycle genes homology region*) [231]. Una vez se ha completada la replicación del ADN, Cdc25C desfosforila la ciclina B y se activa el complejo Cdk1-ciclina B para iniciarse la mitosis. Por lo que se conoce, Chk1, en el caso de estar activada, estaría inhibiendo Cdc25 y, por lo tanto, impidiendo que ciclina B se activara y se entrara en mitosis. En este trabajo no hemos estudiado en profundidad estos procesos, únicamente hemos determinado la expresión de ciclina B1 total en las células como marcador de la fase del ciclo celular. La observación de que la inhibición de Chk1 incrementa la concentración de ciclina B1 en las células permite especular que Chk1 podría tener un papel bien en la expresión de ciclina B1 directamente, bien en su degradación.

Para completar el estudio decidimos analizar si la entrada prematura en mitosis en células las células tratadas con Fmev, que presentan la replicación del

ADN alterada, daba como resultado mitosis aberrantes. Para ello llevamos a cabo un estudio por inmunocitoquímica de la proteína α -tubulina como marcador de la integridad y correcta formación del huso mitótico. Los resultados revelaron que, en primer lugar, las células controles sometidas a la inhibición de ATR y Chk1 entran en mitosis de forma prematura por cuanto encontramos células en mitosis ya a las 13 horas de estudio, mientras que no era así en las células controles. Sin embargo estas mitosis eran relativamente normales. En el caso del UCN01 encontramos algunas mitosis con husos formados pero una porción de los cromosomas no están anclados al huso. Es posible que las células que no hayan terminado de duplicar su ADN (aquellas que se encuentren al principio de S) presenten más dificultades a la hora de anclarse al huso mitótico que aquellas que tengan prácticamente el 100% de su ADN replicado. En células bajo los efectos del NU 6027 se observan incluso anafases normales por lo que no parece que la inhibición de ATR produzca grandes alteraciones en las mitosis a pesar de que estas se den de forma prematura. En cuanto a la inhibición de ATR y Chk1 en células bajo los efectos del Fmev, sí encontramos alteraciones importantes. En primer lugar hay un llamativo incremento de las mitosis en comparación con las células únicamente tratadas con Fmev, en las que solo se observan células en interfase (G0/G1 o S). Por otro lado, vemos que el efecto es más rápido en las células tratadas con UCN01 - en las que el incremento de ciclina B1 es menor - ya que a las 13 horas ya se observan células mitóticas que no se detectan en el caso del tratamiento de Fmev más NU 6027. Se ha mencionado anteriormente que en las células tratadas con Fmev se activan tanto la vía de ATM como la de ATR. Pues bien, es posible que ante la inhibición de ATR la vía de ATM adquiera una mayor relevancia y sea capaz de cubrir parcialmente la inhibición de ATR [92, 93]. Más aun, se ha comprobado que ATM es capaz de fosforilar a Chk1 [232], por lo que es posible que durante algún tiempo la activación de ATM pueda mantener el punto de control, aunque este punto no lo hemos abordado en el presente estudio.

En cualquier caso, la prolongación de la incubación de células tratadas con Fmev con cualquiera de los inhibidores (UCN01 y NU 6027) da como resultado mitosis aberrantes y un incremento de la muerte celular, efectos que son más rápidos con UCN01. El hecho de que no observemos células más allá de metafase sugiere que las células entran en mitosis con alteraciones en la formación del huso

mitótico y, ante la incapacidad de llevar a cabo una mitosis normal, entran en proceso de muerte.

5.3 EL ESTRÉS REPLICATIVO PROVOCADO POR FLUOROMEVALONATO SE ASOCIA A LA DEFICIENCIA DE ATP PROVOCADA POR LA CONTINUA FOSFORILACIÓN DE MEVALONATO

5.3.1. Los antioxidantes no revierten el efecto del fluoromevalonato

Una vez esclarecido el mecanismo a través del cual el tratamiento con Fmev retiene las células HL-60 se la fase S del ciclo celular e impide su proliferación, nuestro interés ha sido descifrar las causas de dicho efecto. Es bien conocido que las especies reactivas de oxígeno (ROS) causan daño oxidativo al ADN y que este daño es de tipo DSB [190, 233]. Ante el aumento de γ -H2AX en las células tratadas con Fmev decidimos analizar la presencia de ROS en las células. Para ello se llevó a cabo un estudio con DCFH₂-DA y se observó un incremento de su oxidación en las células tratadas con Fmev, indicativo de la mayor presencia de ROS. A la vista de estos resultados nos planteamos analizar si determinados agentes antioxidantes, al anular la acumulación de ROS, podrían prevenir el efecto del Fmev. Se emplearon quercetina, ácido ascórbico y vitamina E, a dosis suficientemente altas y se comprobó que todos ellos reducían la formación de ROS en las células tratadas con Fmev, anulándose las diferencias con respecto a las no tratadas. Sin embargo, ninguno de dichos antioxidantes impidió la parada del ciclo celular en fase S inducida por el Fmev. Cabe decir que el estrés oxidativo originado por el Fmev es muy pequeño si se compara, por ejemplo, con células HL-60 con NADPH oxidasa activada con PMA [234]. En cualquier caso, estos resultados descartan a los radicales libres como el agente causal del daño en ADN observado en las células HL-60 tratadas con Fmev.

5.3.2. El tratamiento con fluoromevalonato produce un descenso de la concentración intracelular de ATP que se previene inhibiendo la enzima HMG-CoA reductasa

En su metabolismo, el mevalonato se fosforila dos veces por la acción sucesiva de la mevalonato quinasa y la mevalonato fosfato quinasa y, a

continuación es objeto de la acción de la MVD, dando lugar a isopentenil difosfato. En el balance de estas tres reacciones se consumen 3 moléculas de ATP, dando lugar a otras tantas moléculas de ADP y un equivalente de fosfato, los otros dos quedando retenidos en el isopentenil difosfato (**Esquema 2**). Estos dos fosfatos se recuperan en la reacción catalizada por la escualeno sintasa. La inhibición de la MVD por acción del Fmev provoca la acumulación de MVPP que, en ausencia de otras fosfatasa conocidas para MVPP, debe conllevar la retención de fosfato, actuando el mevalonato como un sumidero de fosfato. Una situación análoga, de retención de fosfato en un compuesto orgánico, ocurre en la deficiencia de fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa hepática (Intolerancia hereditaria a la fructosa), donde tras la ingesta de fructosa y su fosforilación por la fructosa quinasa, se acumula fructosa-1-P. Aunque en menor grado esta situación también se presenta en personas sanas tras la ingesta de elevadas cantidades de fructosa. En estas situaciones se produce un descenso de la concentración de P_i en el hepatocito, que precede el descenso de la concentración de ATP. La disminución de la concentración de P_i , por un lado, frena la regeneración de ATP en la fosforilación oxidativa. Por otro lado, la acción de la adenilato quinasa, conduce a un incremento de la concentración de AMP, que puede degradarse para formar ácido úrico. En resumen, la acumulación intracelular de algún metabolito fosforilado puede conducir al descenso de la concentración de ATP y a la descompensación entre los diferentes nucleótidos de adenina y el P_i [235], con evidentes consecuencias para la fisiología celular.

Con estos antecedentes nos propusimos estudiar el efecto del tratamiento con Fmev sobre la concentración de ATP celular y sus consecuencias para la proliferación. Los resultados mostraron que el tratamiento con Fmev produce una disminución del contenido de ATP que se da desde las primeras 3 horas de tratamiento y se mantiene mientras que el compuesto continúe en el medio de cultivo. Dado que el propio Fmev, para su acción debe fosforilarse primero [22], nos preguntamos si esto sería significativo en cuanto al descenso de la concentración de ATP. Digamos que esta posibilidad estaba prácticamente descartada teniendo en cuenta que la lovastatina y las LDL prevenían los efectos del Fmev aun cuando este compuesto estaba presente en el medio de cultivo. En cualquier caso, para abordarlo directamente determinamos la concentración de

ATP en las células tratadas con Fmev pero conjuntamente con lovastatina o dosis altas de LDL (como en los experimentos de ciclo celular) y comprobamos que en este caso, la concentración de ATP no disminuía significativamente en comparación con las células no tratadas con Fmev. Estos resultados permiten atribuir la disminución de ATP en las células tratadas con Fmev principalmente a la metabolización de mevalonato, el cual debe estar sintetizándose de forma continua e intensamente a tenor de la elevada expresión de la HMG-CoA reductasa que se observa en esta condición. Así, la inhibición competitiva de esta enzima con lovastatina o de su expresión con LDL, contiene el gasto de ATP.

Una de las alternativas para prevenir los efectos de la deficiencia intracelular de P_i que se ha utilizado en animales de experimentación, es la administración de fosfato. Los efectos de este tratamiento son variables dependiendo del tejido – menor en hígado que en riñón, lo cual se ha atribuido a la distinta capacidad del tipo celular en cuestión para captar fosfato [236]. En nuestro caso, el medio de cultivo utilizado ya contiene una concentración de fosfato de 6 mM (más de 4 veces superior a la fisiológica), por lo que no se ha intentado incrementarla para intentar prevenir los efectos del Fmev.

Tratamos de prevenir la deficiencia de ATP suministrando a las células glucosa, como fuente energética, o bien creatina como fosfágeno [237, 238]. Es bien conocido que incluso en presencia de oxígeno las células tumorales producen ATP fundamentalmente a través de la glucólisis. Mas aún, estas células mantienen la producción de ATP mediante el incremento del influjo de glucosa para satisfacer las necesidades energéticas de la célula para proliferar [239]. A pesar de ello, las células HL-60 parecen depender más, en condiciones normales, de los ácidos grasos que de la glucosa para la síntesis de ATP [240]. En nuestras condiciones de cultivo, donde el medio contiene una concentración de glucosa de 11,1 mM, podría anticiparse que disponen de suficiente sustrato como para proveer la necesaria energía. En cualquier caso, el incremento de la concentración de glucosa en el medio no previno el descenso de la concentración de ATP ni la inhibición de la proliferación de las células tratadas con Fmev. Resultados igualmente negativos se obtuvieron cuando se suplementó el medio con creatina. Estos datos confirmaban la hipótesis de que la acumulación de MVPP estaría actuando de sumidero de

fosfato, y por más que se suministre sustrato para la glucólisis o se facilite la posibilidad de regenerar ATP a partir de creatina fosfato, el problema subsiste.

Por otra parte, tratamos de mimetizar los efectos del Fmev sobre la proliferación con 2-DOG y oligomicina- inhibidores de la glucólisis y la fosforilación oxidativa respectivamente - ya que, como es conocido y comprobamos en nuestro sistema, también producen un descenso de la concentración de ATP, similar al producido por Fmev. Contrariamente al Fmev, tanto la oligomicina como la 2-DOG provocaron una ligera acumulación de las células en la fase G1 del ciclo, indicando que el mecanismo subyacente debía de ser distinto. Nuestros resultados con oligomicina y 2-DOG están básicamente de acuerdo con los publicados anteriormente por Sweet y Singh, que señalaban que las células HL-60 se acumulaban en dos puntos de control energéticos (G1 y G2/M) que se activaban en función de la magnitud de la depleción de ATP [241]. Más recientemente, Suganuma y col. han reportado que las células HL-60 apenas sufren inhibición de la proliferación por estos compuestos que, en cambio, sí afectan y muy intensamente a otras líneas celulares [240]. La observación, además, de que las HL-60 consumen poca glucosa llevó a estos autores a proponer que estas células generarían energía a través de la oxidación de los ácidos grasos y/o glutamina en condiciones normales y que, por tratamiento con oligomicina, cambiarían la vía metabólica de la fosforilación oxidativa a la glucólisis para mantener la viabilidad. Esta capacidad de adaptación podría explicar los efectos observados en el presente trabajo, donde el tratamiento con aquellos inhibidores de la síntesis de ATP impiden la proliferación de una pequeña población de células, que se detienen en G1. Por último, hay que tener en cuenta además que, si bien el tratamiento con oligomicina y 2-DOG provoca una disminución de la síntesis de ATP, la disponibilidad de fosfato no se ve comprometida, lo que presuntamente no ocurre con Fmev, apelando de nuevo a una deficiencia de fosfato como causa de sus efectos.

5.3.3. El fluoromevalonato conduce a la activación de la vía de AMPK

Como hemos constatado el tratamiento con Fmev reduce los niveles de ATP intracelular lo que implicará, a su vez, un incremento de AMP, extremo que, no

obstante, no hemos podido demostrar directamente por no tener disponible en el laboratorio la técnica analítica necesaria. De ser así, la variación del cociente AMP/ATP activaría la proteína AMPK cuya función es la de bloquear las vías que consumen ATP y activar las que lo generan para recuperar los niveles de ATP adecuados [242]. Basándonos en estas premisas nos propusimos estudiar la activación de esta proteína por efecto del tratamiento con Fmev. Los resultados mostraron que tras 3 horas en presencia del inhibidor de la MVD la forma fosforilada - activa - de la AMPK se incrementaba y se mantenía por encima del nivel del control mientras se prolongara el tratamiento. Este resultado sugiere, de nuevo, que el tratamiento con Fmev produce el incremento de la concentración de AMP, además de la disminución de ATP.

La proteína quinasa LKB1 está descrita como un supresor de tumores que fosforila y activa AMPK en respuesta a un descenso de los niveles de ATP [243, 244]. Esta proteína es la principal activadora de AMPK en células musculares y en hígado. En realidad lo que se ha postulado es que la unión de AMP en lugar de ATP produce un cambio conformacional en la proteína que expone el dominio catalítico de la misma facilitando así la fosforilación por LKB1 [245]. Sin embargo, se ha demostrado que en células con una inactivación genética de LKB1, el compuesto AICAR puede inducir la activación de AMPK [246]. AICAR, es un análogo de AMP que es captado por la célula y fosforilado por la enzima adenosina quinasa, mimetizando de este modo el efecto de activación de AMP sobre AMPK [247]. La activación de AMPK en células carentes de LKB1 sugería la presencia de otras quinasas para AMPK. Estos autores proponen a ATM como posible responsable de la activación de AMPK - en presencia de AICAR - en células carentes de LKB1 ya que la inhibición de ATM con KU-55933 previene la activación de AMPK [246]. No parece, sin embargo, que en células tratadas con AICAR, ATM se active de la misma manera que lo hace en células con ADN dañado ya que, ni ATM (en la serina 1981) ni H2AX, se fosforilan por el tratamiento con AICAR [248].

Como se ha comentado, AICAR es un activador de AMPK. Se ha demostrado que este compuesto provoca la inhibición de la proliferación de diferentes líneas celulares, pero los efectos difieren en función de la línea. Así, mientras que en algunos tipos celulares como las células CaSki de cáncer cervical, el tratamiento con AICAR induce un bloqueo en fase S [178], en células neuronales se ha

observado un bloqueo en G1 mediado por la activación de p53 [249]. Por tanto, nos propusimos comprobar cual era el efecto del tratamiento con AICAR en las células HL-60 y comprobamos que, igual que Fmev, AICAR inhibía la progresión a través de la fase S. AICAR también incrementaba la formación de γ -H2AX en las células en S y la activación de Chk1 (p-Chk1). El conjunto de estos datos muestra por primera vez que el tratamiento con AICAR conduce a estrés replicativo, al menos en las células HL-60. A su vez, sugerían una participación de AMPK en los efectos de Fmev.

La activación de la proteína AMPK lleva a una inhibición de la vía de mTOR. Se ha demostrado que esta vía es clave en el crecimiento celular y la proliferación [195] por lo que nos planteamos si los efectos observados con Fmev eran la consecuencia de la inhibición de la vía de mTOR por activación de AMPK. Se ha demostrado previamente que, en células tumorales como HeLa, HepG2 o MCF-7, el tratamiento con resveratrol - compuesto que activa AMPK - inhibe a mTOR, lo que se traduce en una inhibición de la proliferación [250].

El compuesto rapamicina es un inhibidor de mTOR [251]. En el presente trabajo comprobamos que el tratamiento con rapamicina no afectaba la progresión del ciclo celular ni la síntesis de ADN de las células HL-60, por lo que no parece que los efectos del Fmev estén mediados por la vía de mTOR.

Habiendo descartado la implicación de mTOR en los efectos de Fmev, comprobamos si la inhibición de AMPK prevenía alguno de ellos. El Compuesto C se ha descrito como inhibidor de AMPK, por lo que lo empleamos en combinación con Fmev o AICAR para comprobar si la inhibición de AMPK prevenía el bloqueo en fase S. Los resultados mostraron una aparente recuperación de la distribución del ciclo celular tanto en células tratadas con Fmev como en las tratadas con AICAR, lo que nos indujo a pensar que probablemente AMPK podía estar mediando los efectos de Fmev. Sin embargo comprobamos que el tratamiento con Compuesto C no permitía que las células proliferasen (el número de células se mantenía o incluso descendía) y, además, que el tratamiento de células controles (no tratadas con Fmev) provocaba un bloqueo del ciclo celular en las fases G1 y G2/M. Otros autores ya habían descrito la inhibición de la proliferación provocada por Compuesto C [252]. Estos autores mostraron que el tratamiento con Compuesto C provocaba un bloqueo del ciclo celular en G1 mediado por la activación de la

proteína p21, que no era evitado por la adición de AICAR. Los datos sugerían que la activación de p21 provocada por Compuesto C era independiente de AMPK. Por otro lado, se ha demostrado un papel de AMPK en mitosis [253], lo que explica el bloqueo en G2/M observado por nosotros. Por tanto, era posible que los efectos sobre la distribución del ciclo celular observados al combinar Fmev y Compuesto C fueran la imagen de tres efectos independientes que se producen al tiempo en las distintas poblaciones (fases) que se encuentran en un cultivo de células asincrónicas: por un lado las células que se encontraran en G1 quedarían bloqueadas en dicha fase por activación de p21; por otro lado, las células en fase S estarían bajo el efecto del Fmev, quedando retenidas en dicha fase; y las que estuvieran en G2 no podrían dividirse al estar la AMPK inhibida por efecto del Compuesto C. Así, decidimos realizar experimentos con células sincronizadas. Se empleó para ello el mismo método de sincronización que en experimentos anteriores (con nocodazol) y tanto Fmev como Compuesto C se añadieron a las células cuando estas se encontraban al inicio de S. Los resultados mostraron que las células tratadas simultáneamente con Compuesto C y Fmev permanecían en fase S igual que lo hacían las que tenían AMPK activa (tratadas únicamente con Fmev). Así pues, no parece que AMPK esté mediando la parada en fase S provocada por Fmev.

Por último comprobamos los efectos que tanto la activación de AMPK, como su inhibición tenían sobre el contenido de ATP en células tratadas con Fmev. Ya se conocía que AICAR produce una disminución del contenido de ATP en otras células [247, 254, 255]. Este dato se confirmó en las células HL-60. Por otra parte, comprobamos que el Compuesto C también disminuía el contenido celular de ATP, como ya habían descrito otros autores [256]. Finalmente, el Compuesto C tampoco prevenía la disminución del ATP por efecto de AICAR ni de Fmev.

Por tanto, también en el caso de AICAR más Compuesto C, la supuesta recuperación de la distribución normal del ciclo celular podía ser el resultado de la suma de tres efectos: parada en G1 y G2/M por efecto de Compuesto C y parada en S por efecto del tratamiento con AICAR. El conjunto de estos datos indica que la proteína AMPK no está mediando los efectos de Fmev como pensamos en un principio. Además, nos permite proponer que AICAR y Fmev ejercen un efecto similar en el ciclo celular por estrés replicativo atribuible al déficit de ATP. De

hecho ya se había demostrado en otros sistemas que el descenso de la proliferación provocado por AICAR era independiente de la activación de AMPK y que podía estar relacionado con un efecto no específico de AICAR sobre el metabolismo de nucleótidos como se comentará más adelante [247, 257].

5.3.4. El estrés metabólico producido por la acumulación de mevalonato difosfato conduce a una deficiencia de desoxirribonucleótidos que es responsable del estrés replicativo provocado por fluoromevalonato

La síntesis y degradación de nucleótidos son procesos fundamentales para las células proliferantes. Así, alteraciones que producen variaciones en el balance de los desoxirribonucleótidos (dNTPs) o en su contenido, dan lugar a inestabilidad genómica al afectar la replicación del ADN [200, 258, 259]. El mantenimiento de las células en condiciones de baja disponibilidad de dNTPs lleva a poner en marcha un mecanismo compensatorio que consiste en activar un mayor número de orígenes de replicación en G1, cuando en condiciones normales los orígenes de replicación durmientes se activarían en S [259]. Como consecuencia, cuando la replicación comienza con un bajo nivel de dNTPs se provoca estrés replicativo - con colapso de las horquillas de replicación - y daño en el ADN [259].

La enzima ribonucleótido reductasa (RNR) cataliza la sustitución del grupo 2'-hidroxilo de los ribonucleótidos difosfato por hidrógeno obteniéndose un dNDP [260]. El dTDP se sintetiza mediante la timidilato quinasa a partir de dTMP. De esta forma, la célula obtiene los desoxirribonucleótidos necesarios para sintetizar el ADN. La RNR se regula a través de varios mecanismos el más importante de los cuales es a través de los dos sitios alostéricos presentes en la subunidad RNR1, de mayor masa molecular: uno de los sitios monitoriza el balance de los cuatro dNTPs y ajusta la actividad enzimática para mantener su equilibrio mientras que el otro regula la cantidad total de dNTPs monitorizando el cociente dATP/ATP. Así, la enzima RNR se activará por unión de ATP y se inactivará por unión de dATP [258].

Pero para mantener un correcto balance del contenido de los nucleótidos es necesario también un control de su degradación. Dos de las enzimas fundamentales para la degradación de los nucleótidos de adenina son la AMP desaminasa, que convierte AMP en IMP y es especialmente activa en el hepatocito,

y la adenosina desaminasa (ADA) que se encarga de la degradación de adenosina a inosina y parece ser muy activa en linfocitos. Mutaciones en esta enzima dan lugar a un síndrome de herencia autonómica recesiva conocido como síndrome de inmunodeficiencia combinada grave (SCIDS). La fisiopatología del trastorno implica la “autodestrucción” de las células diferenciadas tras la estimulación antigénica, posiblemente por la acumulación en los tejidos linfáticos de adenosina, desoxiadenosina y dATP, junto a un agotamiento del ATP que inhibe la síntesis de nucleótidos por parte de la RNR.

En el apartado anterior habíamos mencionado que el bloqueo en fase S provocado por AICAR y la inhibición de la proliferación observada no eran el resultado de la activación de AMPK sino que más bien podría estar relacionado con algún efecto secundario sobre el metabolismo de nucleótidos. Thomas, CB y colaboradores demostraron que el efecto inhibitorio de AICAR era revertido por la adición de uridina al medio [261]. Según estos autores, el efecto estaba asociado con la depleción de UTP y CTP provocada por AICAR, lo que a su vez parecía estar relacionado con la inhibición de la enzima UMP sintasa. Por su parte, López y col. [262] observaron que la apoptosis inducida por AICAR en células Jurkat se evitaba añadiendo adenosina al medio.

Con esos antecedentes nos planteamos si el estrés replicativo observado en las células HL-60, fruto del tratamiento con Fmev, pudiera ser el resultado de una disminución del contenido de dNTPs como consecuencia de la deficiencia de ATP producida. Estudios previos habían mostrado que un descenso del nivel de dNTPs, o una alteración del balance de los mismos, puede ser complementado por la adición de precursores de nucleótidos exógenos que reestablezcan la progresión normal de las horquillas de replicación, permitiendo de este modo una replicación normal del ADN [263, 264]. El motivo de suplementar el medio con los precursores de los dNTPs es que las células no son capaces de captar nucleótidos del medio por lo que suministramos a los cultivos una mezcla de los cuatro desoxirribonucleósidos (dN) como fuente de los mismos. Estos dNs son tomados por las células, fosforilados y utilizados para la síntesis de ADN [199].

Por otro lado añadimos un inhibidor de la enzima ADA para comprobar si frenando la degradación de dATP podíamos revertir los efectos de Fmev. Comprobamos que, mientras que la adición de dNs revertía de forma

estadísticamente significativa la inhibición de la proliferación producida por Fmev a todos los tiempos estudiados, la adición de pentostatina sólo fue efectiva durante las primeras 24 horas y que posteriormente las células volvían a dejar de proliferar. Los resultados de las citometrías confirmaron los datos de proliferación.

Realizamos un estudio similar pero con AICAR, observando que la mezcla de dNs prevenía los efectos de este compuesto, normalizando el ciclo celular y recuperando la proliferación. Estos resultados amplían las conclusiones alcanzadas por Thomas y cols. 1981 y López y col. (2003) comentadas arriba, indicando firmemente que la inhibición de la proliferación producida por AICAR es consecuencia directa de la deficiencia de dNTP. Por su parte, el hecho de que la adición de dNs evitara, al menos en parte, la inhibición de la proliferación inducida por el Fmev sugieren que la inhibición de la MVD conduce a una deficiencia de dNTPs, consecuencia del déficit de ATP. El hecho de que la pentostatina ejerza sólo un pequeño beneficio y en las primeras horas de incubación, permite descartar que la deficiencia de dNTPs sea debida a una elevada tasa de degradación de dichos nucleótidos por acción de la ADA.

La profundización en este estudio requeriría el análisis de las concentraciones de los distintos ribo y desoxirribonucleótidos, así como medición de las actividades de la RNR y de la ADA, algo que se pretende realizar en un futuro próximo.

Los resultados obtenidos hasta la fecha permiten describir, aunque sea a grandes trazos, la causa y los mecanismos que conducen desde la inhibición de la MVD hasta la inhibición de la proliferación, donde la fosforilación del mevalonato es causa del agotamiento del ATP y la imposibilidad de metabolizar el MVPP reduce el P_i intracelular, todo lo cual disminuye la provisión de dNTP necesarios para la replicación del ADN, produciendo un estrés replicativo que es detectado por ATR y canalizado por Chk1 para la detención del ciclo celular en fase S. En una hipotética situación de baja actividad de MVD, el aporte continuo de mevalonato agravaría el síndrome, mientras que el colesterol lo aliviaría al reprimir la HMG-CoA reductasa, como también lo haría la inhibición competitiva de esta enzima con estatinas. Si la situación se prolongara en el tiempo, las alteraciones en el genoma seguramente se incrementarían pero la inhibición de la vía de ATR-Chk1 aceleraría la muerte de dichas células al provocar su entrada prematura en mitosis.

Estos resultados describen una nueva conexión entre la vía de síntesis de colesterol y la proliferación celular, que podría extrapolarse a otras alteraciones metabólicas donde se acumulen metabolitos fosforilados.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La inhibición de la enzima mevalonato difosfato descarboxilasa (MVD) por efecto del tratamiento con fluoromevalonato reduce, pero no bloquea, la biosíntesis de colesterol, provocando la acumulación de mevalonato difosfato (MVPP), el sustrato fisiológico de la enzima.
2. El tratamiento de las células HL-60 y Molt-4 con fluoromevalonato inhibe la proliferación celular por un efecto citostático que impide el avance a través de la fase S del ciclo celular. Dicho efecto es reversible, en cuanto que la eliminación del inhibidor permitió la progresión del ciclo celular restableciéndose la proliferación.
3. Los efectos de fluoromevalonato sobre la proliferación son dependientes de la disponibilidad de mevalonato, por cuanto se agravan cuando esta se incrementa y se amortiguan cuando se inhibe competitivamente la HMG-CoA reductasa con lovastatina o su expresión empleando altas dosis de colesterol LDL. En correspondencia con ello, las células tumorales que presentan una elevada tasa de proliferación y por tanto una elevada actividad de HMG-CoA reductasa son las más sensibles al tratamiento con el inhibidor de la MVD.
4. El tratamiento con fluoromevalonato genera un estrés replicativo en la célula que incrementa de la presencia de la proteína γ -H2AX, marcador de dobles roturas en la cadena de ADN. Como resultado del estrés replicativo se activa la vía de ATR-Chk1, que es responsable del retraso en el avance a través de la fase S mediante la degradación de la proteína Cdc25A.
5. La inhibición experimental de la vía de ATR-Chk1 en células sometidas a estrés replicativo por tratamiento con fluoromevalonato se traduce en la expresión extemporánea de ciclina B1, incrementándose el número de células en fase S que presentan dicha proteína. La prolongación de la incubación de las células en estas condiciones provoca malformaciones en el huso mitótico que dan como resultado mitosis aberrantes e incremento de la muerte celular.
6. La inhibición de la MVD por acción del fluoromevalonato produce un notable descenso del contenido celular de ATP, que se atribuye a la

acumulación de MVPP por cuanto se previene con lovastatina y con altas dosis de colesterol LDL. La inhibición de la MVD, ante la inexistencia de otras enzimas que metabolicen el MVPP acumulado, supone que el fosfato se retenga en dicho compuesto, constituyéndose en un sumidero de fosfato. La pérdida de ATP así ocasionada no pudo ser evitada incrementando la disponibilidad de glucosa o de creatina.

7. El tratamiento con fluoromevalonato, probablemente a través del descenso de ATP y el consiguiente incremento de AMP, provoca la activación de la proteína AMPK, inhibidora de mTOR. Esta vía, sin embargo, no parece estar implicada en el bloqueo en fase S observado por cuanto la inhibición de mTOR con rapamicina o de AMPK con Compuesto C no impidieron los efectos del fluoromevalonato sobre la proliferación celular y la parada en fase S.
8. El compuesto AICAR, conocido activador de AMPK, produce en las células HL-60 un efecto similar al ejercido por el fluoromevalonato, independiente de AMPK. Los efectos de dicho compuesto sobre la proliferación también se asocian a un estrés replicativo provocado por la deficiencia de ATP, con daño en el ADN y el retraso en el avance a través de S.
9. La adición de desoxirribonucleósidos al medio de cultivo evita la parada del ciclo celular en la fase S y permite la proliferación de las células, tanto en las tratadas con fluoromevalonato como con AICAR, indicando que la causa de los efectos de estos compuestos es la deficiencia de dNTPs consecuencia del agotamiento del ATP.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Maxfield, F.R. and I. Tabas, *Role of cholesterol and lipid organization in disease*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 612-21.
2. Parhami, F., et al., *Role of the cholesterol biosynthetic pathway in osteoblastic differentiation of marrow stromal cells*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(11): p. 1997-2003.
3. Mauch, D.H., et al., *CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1354-7.
4. Martinez-Botas, J., et al., *Cholesterol starvation decreases p34(cdc2) kinase activity and arrests the cell cycle at G2*. Faseb J, 1999. **13**(11): p. 1359-70.
5. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Regulation of the mevalonate pathway*. Nature, 1990. **343**(6257): p. 425-30.
6. Kovacs, W.J., et al., *Disturbed cholesterol homeostasis in a peroxisome-deficient PEX2 knockout mouse model*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 1-13.
7. Hogenboom, S., et al., *Human mevalonate pyrophosphate decarboxylase is localized in the cytosol*. Mol Genet Metab, 2004. **81**(3): p. 216-24.
8. Schroepfer, G.J., Jr., *Sterol biosynthesis*. Annu Rev Biochem, 1982. **51**: p. 555-85.
9. Marin Bivens, C.L., et al., *Meiosis-activating sterol promotes the metaphase I to metaphase II transition and preimplantation developmental competence of mouse oocytes maturing in vitro*. Biol Reprod, 2004. **70**(5): p. 1458-64.
10. Rozman, D., et al., *Pre-cholesterol precursors in gametogenesis*. Mol Cell Endocrinol, 2005. **234**(1-2): p. 47-56.
11. Wong, J., et al., *Endogenous 24(S),25-epoxycholesterol fine-tunes acute control of cellular cholesterol homeostasis*. J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 700-7.
12. Rao, S., et al., *Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7797-802.
13. Faust, J.R., M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Synthesis of delta 2-isopentenyl tRNA from mevalonate in cultured human fibroblasts*. J Biol Chem, 1980. **255**(14): p. 6546-8.
14. Edwards, P.A. and J. Ericsson, *Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 157-85.
15. Levental, I., M. Grzybek, and K. Simons, *Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts*. Biochemistry. **49**(30): p. 6305-16.
16. DeBose-Boyd, R.A., *Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase*. Cell Res, 2008. **18**(6): p. 609-21.
17. Milunsky, J.M., T.A. Maher, and A.B. Metzenberg, *Molecular, biochemical, and phenotypic analysis of a hemizygous male with a severe atypical phenotype for X-linked dominant Conradi-Hunermann-Happle syndrome and a mutation in EBP*. Am J Med Genet A, 2003. **116A**(3): p. 249-54.
18. Traupe, H. and C. Has, *The Conradi-Hunermann-Happle syndrome is caused by mutations in the gene that encodes a 8- 7 sterol isomerase and is*

- biochemically related to the CHILD syndrome.* Eur J Dermatol, 2000. **10**(6): p. 425-8.
19. Waterham, H.R., et al., *Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene.* Am J Hum Genet, 2003. **72**(4): p. 1013-7.
 20. Krakowiak, P.A., et al., *Lathosterolosis: an inborn error of human and murine cholesterol synthesis due to lathosterol 5-desaturase deficiency.* Hum Mol Genet, 2003. **12**(13): p. 1631-41.
 21. Castillo, M., et al., *Effect of phenylalanine derivatives on the main regulatory enzymes of hepatic cholesterologenesis.* Mol Cell Biochem, 1991. **105**(1): p. 21-5.
 22. Nave, J.F., et al., *Mechanism of the inhibition of cholesterol biosynthesis by 6-fluoromevalonate.* Biochem J, 1985. **227**(1): p. 247-54.
 23. Reszka, A.A. and G.A. Rodan, *Mechanism of action of bisphosphonates.* Curr Osteoporos Rep, 2003. **1**(2): p. 45-52.
 24. Bergstrom, J.D., et al., *Zaragozic acids: a family of fungal metabolites that are picomolar competitive inhibitors of squalene synthase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(1): p. 80-4.
 25. Labit-Le Bouteiller, C., et al., *Antiproliferative effects of SR31747A in animal cell lines are mediated by inhibition of cholesterol biosynthesis at the sterol isomerase step.* Eur J Biochem, 1998. **256**(2): p. 342-9.
 26. Dvornik, D. and P. Hill, *Effect of long-term administration of AY-9944, an inhibitor of 7-dehydrocholesterol delta 7-reductase, on serum and tissue lipids in the rat.* J Lipid Res, 1968. **9**(5): p. 587-95.
 27. Boogaard, A., M. Griffioen, and L.H. Cohen, *Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in human hepatoma cell line Hep G2. Effects of inhibitors of cholesterol synthesis on enzyme activity.* Biochem J, 1987. **241**(2): p. 345-51.
 28. Suarez, Y., et al., *Synergistic upregulation of low-density lipoprotein receptor activity by tamoxifen and lovastatin.* Cardiovasc Res, 2004. **64**(2): p. 346-55.
 29. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth.* J Lipid Res, 1980. **21**(5): p. 505-17.
 30. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol.* J Lipid Res, 1984. **25**(13): p. 1450-61.
 31. Sudhof, T.C., et al., *The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins.* Science, 1985. **228**(4701): p. 815-22.
 32. Gil, G., M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from the hamster. II. Isolation of the gene and characterization of the 5' flanking region.* J Biol Chem, 1986. **261**(8): p. 3717-24.
 33. Reynolds, G.A., et al., *HMG CoA reductase: a negatively regulated gene with unusual promoter and 5' untranslated regions.* Cell, 1984. **38**(1): p. 275-85.
 34. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor.* Cell, 1997. **89**(3): p. 331-40.

35. Shimomura, I., et al., *Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13656-61.
36. Kim, J.B., et al., *Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1*. J Clin Invest, 1998. **101**(1): p. 1-9.
37. Horton, J.D., et al., *Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2*. J Clin Invest, 1998. **101**(11): p. 2331-9.
38. Kim, J.B. and B.M. Spiegelman, *ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism*. Genes Dev, 1996. **10**(9): p. 1096-107.
39. Horton, J.D., et al., *Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12027-32.
40. Pai, J.T., et al., *Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins*. J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 26138-48.
41. Espenshade, P.J., W.P. Li, and D. Yabe, *Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11694-9.
42. Hua, X., et al., *Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins requires sequences on both sides of the endoplasmic reticulum membrane*. J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 10379-84.
43. DeBose-Boyd, R.A., et al., *Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi*. Cell, 1999. **99**(7): p. 703-12.
44. Sundqvist, A., et al., *Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7)*. Cell Metab, 2005. **1**(6): p. 379-91.
45. Brown, A.J., et al., *Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 237-45.
46. Mohn, K.L., et al., *The immediate-early growth response in regenerating liver and insulin-stimulated H-35 cells: comparison with serum-stimulated 3T3 cells and identification of 41 novel immediate-early genes*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(1): p. 381-90.
47. Yang, T., et al., *Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER*. Cell, 2002. **110**(4): p. 489-500.
48. Yabe, D., M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12753-8.
49. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1125-31.

50. Janowski, B.A., *The hypocholesterolemic agent LY295427 up-regulates INSIG-1, identifying the INSIG-1 protein as a mediator of cholesterol homeostasis through SREBP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12675-80.
51. Yabe, D., et al., *Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3155-60.
52. Engelking, L.J., et al., *Schoenheimer effect explained--feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins*. J Clin Invest, 2005. **115**(9): p. 2489-98.
53. Goldstein, J.L., R.A. DeBose-Boyd, and M.S. Brown, *Protein sensors for membrane sterols*. Cell, 2006. **124**(1): p. 35-46.
54. Gong, Y., et al., *Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake*. Cell Metab, 2006. **3**(1): p. 15-24.
55. Engelking, L.J., et al., *Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis*. J Clin Invest, 2004. **113**(8): p. 1168-75.
56. Majdalawieh, A. and H.S. Ro, *PPARgamma1 and LXRAalpha face a new regulator of macrophage cholesterol homeostasis and inflammatory responsiveness, AEBP1*. Nucl Recept Signal. **8**: p. e004.
57. Calkin, A.C. and P. Tontonoz, *Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **30**(8): p. 1513-8.
58. Venkateswaran, A., et al., *Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 12097-102.
59. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
60. Rayner, K.J., et al., *MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis*. Science. **328**(5985): p. 1570-3.
61. Nakanishi, M., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *Multivalent control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Mevalonate-derived product inhibits translation of mRNA and accelerates degradation of enzyme*. J Biol Chem, 1988. **263**(18): p. 8929-37.
62. Osborne, T.F., M. Bennett, and K. Rhee, *Red 25, a protein that binds specifically to the sterol regulatory region in the promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase*. J Biol Chem, 1992. **267**(26): p. 18973-82.
63. Gayen, A.K. and D.M. Peffley, *The length of 5'-untranslated leader sequences influences distribution of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase mRNA in polysomes: effects of lovastatin, oxysterols, and mevalonate*. Arch Biochem Biophys, 1995. **322**(2): p. 475-85.
64. Choi, J.W. and D.M. Peffley, *3'-untranslated sequences mediate post-transcriptional regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mRNA by 25-hydroxycholesterol*. Biochem J, 1995. **307** (Pt 1): p. 233-8.
65. Peffley, D. and M. Sinensky, *Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase synthesis by a non-sterol mevalonate-derived product in Mev-1 cells. Apparent translational control*. J Biol Chem, 1985. **260**(18): p. 9949-52.

66. Peffley, D.M. and A.K. Gayen, *Mevalonate regulates polysome distribution and blocks translation-dependent suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA: relationship to translational control*. Somat Cell Mol Genet, 1995. **21**(3): p. 189-204.
67. Chambers, C.M. and G.C. Ness, *Translational regulation of hepatic HMG-CoA reductase by dietary cholesterol*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **232**(2): p. 278-81.
68. Canto, C. and J. Auwerx, *AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways*. Cell Mol Life Sci. **67**(20): p. 3407-23.
69. Corton, J.M., J.G. Gillespie, and D.G. Hardie, *Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response*. Curr Biol, 1994. **4**(4): p. 315-24.
70. Sever, N., et al., *Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52479-90.
71. Hampton, R.Y., R.G. Gardner, and J. Rine, *Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(12): p. 2029-44.
72. Correll, C.C., L. Ng, and P.A. Edwards, *Identification of farnesol as the non-sterol derivative of mevalonic acid required for the accelerated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase*. J Biol Chem, 1994. **269**(26): p. 17390-3.
73. Malumbres, M., *Revisiting the "Cdk-centric" view of the mammalian cell cycle*. Cell Cycle, 2005. **4**(2): p. 206-10.
74. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Mammalian cyclin-dependent kinases*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(11): p. 630-41.
75. Choi, Y.H., et al., *p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells*. Jpn J Cancer Res, 2000. **91**(2): p. 164-73.
76. Vidal, A. and A. Koff, *Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause*. Gene, 2000. **247**(1-2): p. 1-15.
77. Yew, P.R., *Ubiquitin-mediated proteolysis of vertebrate G1- and S-phase regulators*. J Cell Physiol, 2001. **187**(1): p. 1-10.
78. Sherr, C.J., *Principles of tumor suppression*. Cell, 2004. **116**(2): p. 235-46.
79. Sherr, C.J., *Cancer cell cycles*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1672-7.
80. Pietenpol, J.A. and Z.A. Stewart, *Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis*. Toxicology, 2002. **181-182**: p. 475-81.
81. Mikhailov, A., M. Shinohara, and C.L. Rieder, *The p38-mediated stress-activated checkpoint. A rapid response system for delaying progression through antephase and entry into mitosis*. Cell Cycle, 2005. **4**(1): p. 57-62.
82. Lundberg, A.S. and R.A. Weinberg, *Control of the cell cycle and apoptosis*. Eur J Cancer, 1999. **35**(14): p. 1886-94.
83. Reszka, A.A., J. Halasy-Nagy, and G.A. Rodan, *Nitrogen-bisphosphonates block retinoblastoma phosphorylation and cell growth by inhibiting the cholesterol biosynthetic pathway in a keratinocyte model for esophageal irritation*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(2): p. 193-202.
84. Ng, M.M., F. Chang, and D.R. Burgess, *Movement of membrane domains and requirement of membrane signaling molecules for cytokinesis*. Dev Cell, 2005. **9**(6): p. 781-90.

85. Gorgoulis, V.G., et al., *Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 907-13.
86. Bartkova, J., et al., *DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 864-70.
87. Rhind, N. and P. Russell, *Checkpoints: it takes more than time to heal some wounds*. Curr Biol, 2000. **10**(24): p. R908-11.
88. Cimprich, K.A. and D. Cortez, *ATR: an essential regulator of genome integrity*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(8): p. 616-27.
89. Sancar, A., et al., *Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 39-85.
90. Melo, J. and D. Toczyski, *A unified view of the DNA-damage checkpoint*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(2): p. 237-45.
91. Abraham, R.T., *Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases*. Genes Dev, 2001. **15**(17): p. 2177-96.
92. Hirao, A., et al., *Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(18): p. 6521-32.
93. Gatei, M., et al., *Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 14806-11.
94. Matsuoka, S., et al., *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1160-6.
95. Liu, Q., et al., *Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint*. Genes Dev, 2000. **14**(12): p. 1448-59.
96. Nam, E.A. and D. Cortez, *ATR signalling: more than meeting at the fork*. Biochem J. **436**(3): p. 527-36.
97. Cortez, D., et al., *ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1713-6.
98. Zeng, Y., et al., *Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1*. Nature, 1998. **395**(6701): p. 507-10.
99. Lindsay, H.D., et al., *S-phase-specific activation of Cds1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in Schizosaccharomyces pombe*. Genes Dev, 1998. **12**(3): p. 382-95.
100. Lopez-Girona, A., et al., *Serine-345 is required for Rad3-dependent phosphorylation and function of checkpoint kinase Chk1 in fission yeast*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11289-94.
101. Kumagai, A. and W.G. Dunphy, *Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in Xenopus egg extracts*. Mol Cell, 2000. **6**(4): p. 839-49.
102. Smits, V.A., P.M. Reaper, and S.P. Jackson, *Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response*. Curr Biol, 2006. **16**(2): p. 150-9.
103. Niida, H., et al., *Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(7): p. 2572-81.
104. Boutros, R., C. Dozier, and B. Ducommun, *The when and wheres of CDC25 phosphatases*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(2): p. 185-91.

105. Sanchez, Y., et al., *Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1497-501.
106. Sorensen, C.S., et al., *Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A*. Cancer Cell, 2003. **3**(3): p. 247-58.
107. Syljuasen, R.G., et al., *Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(9): p. 3553-62.
108. Lim, D.S., et al., *ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 613-7.
109. Falck, J., et al., *The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis*. Nature, 2001. **410**(6830): p. 842-7.
110. Falck, J., et al., *The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways*. Nat Genet, 2002. **30**(3): p. 290-4.
111. Shiloh, Y., *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 155-68.
112. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5858-68.
113. Jackson, S.P., *Sensing and repairing DNA double-strand breaks*. Carcinogenesis, 2002. **23**(5): p. 687-96.
114. Paull, T.T., et al., *A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage*. Curr Biol, 2000. **10**(15): p. 886-95.
115. Bakkenist, C.J. and M.B. Kastan, *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. Nature, 2003. **421**(6922): p. 499-506.
116. Ward, I.M. and J. Chen, *Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 47759-62.
117. Zhang, W. and H.T. Liu, *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. Cell Res, 2002. **12**(1): p. 9-18.
118. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. Faseb J, 1995. **9**(9): p. 726-35.
119. Massague, J., *G1 cell-cycle control and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 298-306.
120. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
121. Torii, S., et al., *ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer*. Cancer Sci, 2006. **97**(8): p. 697-702.
122. Bogoyevitch, M.A., *The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting*. Bioessays, 2006. **28**(9): p. 923-34.
123. Yao, R., M. Yoshihara, and H. Osada, *Specific activation of a c-Jun NH2-terminal kinase isoform and induction of neurite outgrowth in PC-12 cells by staurosporine*. J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 18261-6.
124. Mingo-Sion, A.M., et al., *Inhibition of JNK reduces G2/M transit independent of p53, leading to endoreduplication, decreased proliferation, and apoptosis in breast cancer cells*. Oncogene, 2004. **23**(2): p. 596-604.

125. MacCorkle-Chosnek, R.A., et al., *Cell cycle regulation of c-Jun N-terminal kinase activity at the centrosomes*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(1): p. 173-80.
126. Monno, S., et al., *Insulin-like growth factor I activates c-Jun N-terminal kinase in MCF-7 breast cancer cells*. Endocrinology, 2000. **141**(2): p. 544-50.
127. Mamay, C.L., et al., *An inhibitory function for JNK in the regulation of IGF-I signaling in breast cancer*. Oncogene, 2003. **22**(4): p. 602-14.
128. Woodgett, J.R., J. Avruch, and J. Kyriakis, *The stress activated protein kinase pathway*. Cancer Surv, 1996. **27**: p. 127-38.
129. Goss, V.L., et al., *SAPK/JNK regulates cdc2/cyclin B kinase through phosphorylation and inhibition of cdc25c*. Cell Signal, 2003. **15**(7): p. 709-18.
130. Pedram, A., M. Razandi, and E.R. Levin, *Extracellular signal-regulated protein kinase/Jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26722-8.
131. Campos, C.B., P.A. Bedard, and R. Linden, *Activation of p38 mitogen-activated protein kinase during normal mitosis in the developing retina*. Neuroscience, 2002. **112**(3): p. 583-91.
132. Lavoie, J.N., et al., *Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20608-16.
133. Casanovas, O., et al., *Osmotic stress regulates the stability of cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent manner*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35091-7.
134. Bulavin, D.V., et al., *Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase*. Nature, 2001. **411**(6833): p. 102-7.
135. Bulavin, D.V. and A.J. Fornace, Jr., *p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor*. Adv Cancer Res, 2004. **92**: p. 95-118.
136. Engel, F.B., et al., *p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes*. Genes Dev, 2005. **19**(10): p. 1175-87.
137. Ellinger-Ziegelbauer, H., K. Kelly, and U. Siebenlist, *Cell cycle arrest and reversion of Ras-induced transformation by a conditionally activated form of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3857-68.
138. Dmitrieva, N.I., et al., *Rapid activation of G2/M checkpoint after hypertonic stress in renal inner medullary epithelial (IME) cells is protective and requires p38 kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 184-9.
139. Pearce, A.K. and T.C. Humphrey, *Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(10): p. 426-33.
140. Cha, H., et al., *A functional role for p38 MAPK in modulating mitotic transit in the absence of stress*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22984-92.
141. Opekarova, M. and W. Tanner, *Specific lipid requirements of membrane proteins--a putative bottleneck in heterologous expression*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1610**(1): p. 11-22.
142. Suarez, Y., et al., *Differential effects of ergosterol and cholesterol on Cdk1 activation and SRE-driven transcription*. Eur J Biochem, 2002. **269**(6): p. 1761-71.
143. Chen, H.W., A.A. Kandutsch, and C. Waymouth, *Inhibition of cell growth by oxygenated derivatives of cholesterol*. Nature, 1974. **251**(5474): p. 419-21.

144. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol*. J Biol Chem, 1974. **249**(22): p. 7306-14.
145. Martinez-Botas, J., et al., *Dose-dependent effects of lovastatin on cell cycle progression. Distinct requirement of cholesterol and non-sterol mevalonate derivatives*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1532**(3): p. 185-94.
146. Suarez, Y., et al., *Sterol stringency of proliferation and cell cycle progression in human cells*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1734**(2): p. 203-13.
147. Fernandez, C., et al., *Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation*. Exp Cell Res, 2004. **300**(1): p. 109-20.
148. Fernandez, C., et al., *Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression*. J Lipid Res, 2005. **46**(5): p. 920-9.
149. Rodriguez-Acebes, S., et al., *Dose-dependent dual effects of cholesterol and desmosterol on J774 macrophage proliferation*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **377**(2): p. 484-8.
150. Chen, H.W., *Role of cholesterol metabolism in cell growth*. Fed Proc, 1984. **43**(1): p. 126-30.
151. Chen, Z.J., et al., *Association of ABCA2 expression with determinants of Alzheimer's disease*. Faseb J, 2004. **18**(10): p. 1129-31.
152. Siperstein, M.D., *Cholesterol, cholesterologenesis and cancer*. Adv Exp Med Biol, 1995. **369**: p. 155-66.
153. Leonard, D.A. and H.W. Chen, *Aphidicolin, a specific inhibitor of DNA polymerase alpha, inhibits conversion of lanosterol to C-27 sterols in mouse L cells*. J Biol Chem, 1984. **259**(8): p. 4904-9.
154. Bengoechea-Alonso, M.T. and J. Ericsson, *Cdk1/cyclin B-mediated phosphorylation stabilizes SREBP1 during mitosis*. Cell Cycle, 2006. **5**(15): p. 1708-18.
155. Roth, G., et al., *MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro*. J Biol Chem, 2000. **275**(43): p. 33302-7.
156. Cuthbert, J.A. and P.E. Lipsky, *Inhibition by 6-fluoromevalonate demonstrates that mevalonate or one of the mevalonate phosphates is necessary for lymphocyte proliferation*. J Biol Chem, 1990. **265**(30): p. 18568-75.
157. Chakrabarti, R. and E.G. Engleman, *Interrelationships between mevalonate metabolism and the mitogenic signaling pathway in T lymphocyte proliferation*. J Biol Chem, 1991. **266**(19): p. 12216-22.
158. Jakobisiak, M., et al., *Cell cycle-specific effects of lovastatin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3628-32.
159. Keyomarsi, K., et al., *Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin*. Cancer Res, 1991. **51**(13): p. 3602-9.
160. Raiteri, M., et al., *Pharmacological control of the mevalonate pathway: effect on arterial smooth muscle cell proliferation*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **281**(3): p. 1144-53.
161. Crick, D.C., et al., *Geranylgeraniol overcomes the block of cell proliferation by lovastatin in C6 glioma cells*. J Neurochem, 1998. **70**(6): p. 2397-405.
162. Cuthbert, J.A. and P.E. Lipsky, *Negative regulation of cell proliferation by mevalonate or one of the mevalonate phosphates*. J Biol Chem, 1991. **266**(27): p. 17966-71.

163. Hardie, D.G., *AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 774-85.
164. Hawley, S.A., et al., *Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27879-87.
165. Xiao, B., et al., *Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase*. Nature, 2007. **449**(7161): p. 496-500.
166. Suter, M., et al., *Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32207-16.
167. Richter, E.A. and N.B. Ruderman, *AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease*. Biochem J, 2009. **418**(2): p. 261-75.
168. Jensen, T.G., *Gene transfer into human epidermis as an experimental model for somatic gene therapy*. Dan Med Bull, 2004. **51**(2): p. 155-66.
169. Hardie, D.G. and D.A. Pan, *Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(Pt 6): p. 1064-70.
170. Carling, D., et al., *Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities*. Eur J Biochem, 1989. **186**(1-2): p. 129-36.
171. Zhou, G., et al., *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action*. J Clin Invest, 2001. **108**(8): p. 1167-74.
172. Foretz, M., et al., *Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1331-9.
173. Steinberg, G.R. and B.E. Kemp, *AMPK in Health and Disease*. Physiol Rev, 2009. **89**(3): p. 1025-78.
174. Polak, P. and M.N. Hall, *mTOR and the control of whole body metabolism*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(2): p. 209-18.
175. Jones, R.G., et al., *AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint*. Mol Cell, 2005. **18**(3): p. 283-93.
176. Imamura, K., et al., *Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole- 4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**(2): p. 562-7.
177. Liu, G. and G. Lozano, *p21 stability: linking chaperones to a cell cycle checkpoint*. Cancer Cell, 2005. **7**(2): p. 113-4.
178. Guan, T.J., et al., *AICAR inhibits proliferation and induced S-phase arrest, and promotes apoptosis in CaSki cells*. Acta Pharmacol Sin, 2007. **28**(12): p. 1984-90.
179. van den Heuvel, S. and N.J. Dyson, *Conserved functions of the pRB and E2F families*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(9): p. 713-24.
180. Dasgupta, B. and J. Milbrandt, *AMP-activated protein kinase phosphorylates retinoblastoma protein to control mammalian brain development*. Dev Cell, 2009. **16**(2): p. 256-70.

181. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
182. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
183. Bergstrom, J.D., et al., *Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase*. Arch Biochem Biophys, 2000. **373**(1): p. 231-41.
184. Choi, H.J., M. Fukui, and B.T. Zhu, *Role of cyclin B1/Cdc2 up-regulation in the development of mitotic prometaphase arrest in human breast cancer cells treated with nocodazole*. PLoS One. **6**(8): p. e24312.
185. Zieve, G.W., et al., *Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells*. Exp Cell Res, 1980. **126**(2): p. 397-405.
186. Koyuturk, M., M. Ersoz, and N. Altioek, *Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase*. Neurosci Lett, 2004. **370**(2-3): p. 212-7.
187. Kumar, A., et al., *Differential roles of extracellular signal-regulated kinase-1/2 and p38(MAPK) in interleukin-1beta- and tumor necrosis factor-alpha-induced low density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(25): p. 15742-8.
188. Sekine, Y., et al., *High-density lipoprotein induces proliferation and migration of human prostate androgen-independent cancer cells by an ABCA1-dependent mechanism*. Mol Cancer Res. **8**(9): p. 1284-94.
189. Ledo, B., et al., *Papel de p38 MAPK en los efectos de la inhibición de la biosíntesis de colesterol en la progresión del ciclo celular en la línea promielocítica humana HL-60*. Clin Invest Arterioscl, 2008. **20**: p. 190-9.
190. Zhang, H.Y., et al., *In benign Barrett's epithelial cells, acid exposure generates reactive oxygen species that cause DNA double-strand breaks*. Cancer Res, 2009. **69**(23): p. 9083-9.
191. Goloudina, A., et al., *Regulation of human Cdc25A stability by Serine 75 phosphorylation is not sufficient to activate a S phase checkpoint*. Cell Cycle, 2003. **2**(5): p. 473-8.
192. Zhao, B., et al., *Structural basis for Chk1 inhibition by UCN-01*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46609-15.
193. Rodriguez, R. and M. Meuth, *Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(1): p. 402-12.
194. Xiao, Z., et al., *Cyclin B1 is an efficacy-predicting biomarker for Chk1 inhibitors*. Biomarkers, 2008. **13**(6): p. 579-96.
195. Sarbassov, D.D., S.M. Ali, and D.M. Sabatini, *Growing roles for the mTOR pathway*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(6): p. 596-603.
196. Sullivan, J.E., et al., *Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase*. FEBS Lett, 1994. **353**(1): p. 33-6.
197. Izem, L., et al., *Effect of reduced low-density lipoprotein receptor level on HepG2 cell cholesterol metabolism*. Biochem J, 1998. **329** (Pt 1): p. 81-9.
198. Sato, R., *Sterol metabolism and SREBP activation*. Arch Biochem Biophys. **501**(2): p. 177-81.

199. Albert, D.A. and E. Nodzenski, *Deoxyadenosine toxicity and cell cycle arrest in hydroxyurea-resistant S49 T-lymphoma cells*. Exp Cell Res, 1988. **179**(2): p. 417-28.
200. Poli, J., et al., *dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress*. Embo J. **31**(4): p. 883-94.
201. Saven, A. and L. Piro, *Newer purine analogues for the treatment of hairy-cell leukemia*. N Engl J Med, 1994. **330**(10): p. 691-7.
202. Quesney-Huneus, V., M.H. Wiley, and M.D. Siperstein, *Essential role for mevalonate synthesis in DNA replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(10): p. 5056-60.
203. Siperstein, M.D., *Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth*. J Lipid Res, 1984. **25**(13): p. 1462-8.
204. Buhaescu, I. and H. Izzedine, *Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications*. Clin Biochem, 2007. **40**(9-10): p. 575-84.
205. Aguilera, J.A., et al., *Posthatching evolution of in vivo mevalonate metabolism in chick liver*. Biochem Int, 1987. **14**(2): p. 375-83.
206. Iglesias, J., D. Gonzalez-Pacanowska, and E. Garcia-Peregrin, *3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase and acyl-CoA: cholesterol acyl-transferase from mucosa scrapings and isolated enterocytes from chick duodenum, jejunum and ileum*. Biochem Int, 1987. **15**(3): p. 517-23.
207. Zafra, M.F., et al., *Effect of clofibrate on brain mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase*. Neurochem Res, 1987. **12**(9): p. 787-90.
208. Quistad, G.B., et al., *Fluoromevalonate acts as an inhibitor of insect juvenile hormone biosynthesis*. Nature, 1981. **289**: p. 176-177.
209. Henneman, L., et al., *Inhibition of the isoprenoid biosynthesis pathway; detection of intermediates by UPLC-MS/MS*. Biochim Biophys Acta. **1811**(4): p. 227-33.
210. Cuthbert, J.A. and P.E. Lipsky, *Suppression of the proliferation of Ras-transformed cells by fluoromevalonate, an inhibitor of mevalonate metabolism*. Cancer Res, 1995. **55**(8): p. 1732-40.
211. Freed-Pastor, W.A., et al., *Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway*. Cell. **148**(1-2): p. 244-58.
212. Jakobisiak, M. and J. Golab, *Potential antitumor effects of statins (Review)*. Int J Oncol, 2003. **23**(4): p. 1055-69.
213. Suarez, Y., *Efectos de la inhibición de la síntesis de colesterol sobre la actividad del receptor LDL y la proliferación celular "in vitro"*. 2001, Madrid.
214. Kawata, S., et al., *Increase in the active form of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in human hepatocellular carcinoma: possible mechanism for alteration of cholesterol biosynthesis*. Cancer Res, 1990. **50**(11): p. 3270-3.
215. Harwood, H.J., Jr., et al., *In vivo regulation of human leukocyte 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: increased enzyme protein concentration and catalytic efficiency in human leukemia and lymphoma*. J Lipid Res, 1991. **32**(8): p. 1237-52.
216. Bennis, F., et al., *Importance of mevalonate-derived products in the control of HMG-CoA reductase activity and growth of human lung adenocarcinoma cell line A549*. Int J Cancer, 1993. **55**(4): p. 640-5.

217. Saklatvala, J., et al., *Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue*. J Biol Chem, 1996. **271**(12): p. 6586-9.
218. Patel, R., B. Bartosch, and J.L. Blank, *p21WAF1 is dynamically associated with JNK in human T-lymphocytes during cell cycle progression*. J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 15)**: p. 2247-55.
219. Tchou, W.W., et al., *Role of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in cell cycle checkpoint activated by the protease inhibitor N-acetyl-leuciny-leucinylnorleucinal*. Oncogene, 1999. **18**(50): p. 6974-80.
220. Bennett, B.L., et al., *SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13681-6.
221. Xia, H.H., et al., *Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a specific c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) inhibitor, SP-600125, in gastrointestinal cancers*. Cancer Lett, 2006. **241**(2): p. 268-74.
222. Tamemoto, H., et al., *Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(28): p. 20293-7.
223. Guo, Y., et al., *An anticancer agent icaritin induces sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway and inhibits growth of breast cancer cells*. Eur J Pharmacol. **658**(2-3): p. 114-22.
224. Tourriere, H. and P. Pasero, *Maintenance of fork integrity at damaged DNA and natural pause sites*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(7): p. 900-13.
225. Peasland, A., et al., *Identification and evaluation of a potent novel ATR inhibitor, NU6027, in breast and ovarian cancer cell lines*. Br J Cancer. **105**(3): p. 372-81.
226. Hickson, I., et al., *Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM*. Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 9152-9.
227. Warmerdam, D.O. and R. Kanaar, *Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways*. Mutat Res. **704**(1-3): p. 2-11.
228. Zhao, H., J.L. Watkins, and H. Piwnicka-Worms, *Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14795-800.
229. Kurose, A., et al., *Effects of hydroxyurea and aphidicolin on phosphorylation of ataxia telangiectasia mutated on Ser 1981 and histone H2AX on Ser 139 in relation to cell cycle phase and induction of apoptosis*. Cytometry A, 2006. **69**(4): p. 212-21.
230. Maity, A., W.G. McKenna, and R.J. Muschel, *Evidence for post-transcriptional regulation of cyclin B1 mRNA in the cell cycle and following irradiation in HeLa cells*. Embo J, 1995. **14**(3): p. 603-9.
231. Muller, G.A. and K. Engeland, *The central role of CDE/CHR promoter elements in the regulation of cell cycle-dependent gene transcription*. Febs J. **277**(4): p. 877-93.
232. Ng, C.P., et al., *Differential mode of regulation of the checkpoint kinases CHK1 and CHK2 by their regulatory domains*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 8808-19.
233. Lindahl, T. and R.D. Wood, *Quality control by DNA repair*. Science, 1999. **286**(5446): p. 1897-905.

234. Sanchez-Martin, C.C., et al., *Cholesterol starvation induces differentiation of human leukemia HL-60 cells*. Cancer Res, 2007. **67**(7): p. 3379-86.
235. Sriver, C., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th ed. 1995.
236. Morris, R.C., Jr., K. Nigon, and E.B. Reed, *Evidence that the severity of depletion of inorganic phosphate determines the severity of the disturbance of adenine nucleotide metabolism in the liver and renal cortex of the fructose-loaded rat*. J Clin Invest, 1978. **61**(1): p. 209-20.
237. Andres, R.H., et al., *Effects of creatine treatment on survival and differentiation of GABA-ergic neurons in cultured striatal tissue*. J Neurochem, 2005. **95**(1): p. 33-45.
238. Saeedi, R., et al., *Metabolic actions of metformin in the heart can occur by AMPK-independent mechanisms*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(6): p. H2497-506.
239. Gatenby, R.A. and E.T. Gawlinski, *The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models*. Cancer Res, 2003. **63**(14): p. 3847-54.
240. Suganuma, K., et al., *Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation*. Leuk Lymphoma. **51**(11): p. 2112-9.
241. Sweet, S. and G. Singh, *Accumulation of human promyelocytic leukemic (HL-60) cells at two energetic cell cycle checkpoints*. Cancer Res, 1995. **55**(22): p. 5164-7.
242. Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley, *AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol. **13**(4): p. 251-62.
243. Rattan, R., et al., *5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39582-93.
244. Stein, S.C., et al., *The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation*. Biochem J, 2000. **345 Pt 3**: p. 437-43.
245. Shackelford, D.B. and R.J. Shaw, *The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 563-75.
246. Sun, Y., K.E. Connors, and D.Q. Yang, *AICAR induces phosphorylation of AMPK in an ATM-dependent, LKB1-independent manner*. Mol Cell Biochem, 2007. **306**(1-2): p. 239-45.
247. Corton, J.M., et al., *5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?* Eur J Biochem, 1995. **229**(2): p. 558-65.
248. Zajkowicz, A. and M. Rusin, *The activation of the p53 pathway by the AMP mimetic AICAR is reduced by inhibitors of the ATM or mTOR kinases*. Mech Ageing Dev. **132**(11-12): p. 543-51.
249. Zang, Y., et al., *AMP-activated protein kinase is involved in neural stem cell growth suppression and cell cycle arrest by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside and glucose deprivation by down-regulating phospho-retinoblastoma protein and cyclin D*. J Biol Chem, 2009. **284**(10): p. 6175-84.
250. Iqbal, M.A. and R.N. Bamezai, *Resveratrol Inhibits Cancer Cell Metabolism by Down Regulating Pyruvate Kinase M2 via Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin*. PLoS One. **7**(5): p. e36764.

251. Thomson, A.W., H.R. Turnquist, and G. Raimondi, *Immunoregulatory functions of mTOR inhibition*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 324-37.
252. Peyton, K.J., et al., *Compound C inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration in an AMP-activated protein kinase-independent fashion*. J Pharmacol Exp Ther. **338**(2): p. 476-84.
253. Brenman, J.E., *AMPK/LKB1 signaling in epithelial cell polarity and cell division*. Cell Cycle, 2007. **6**(22): p. 2755-9.
254. Pencek, R.R., et al., *5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside causes acute hepatic insulin resistance in vivo*. Diabetes, 2005. **54**(2): p. 355-60.
255. Samari, H.R. and P.O. Seglen, *Inhibition of hepatocytic autophagy by adenosine, aminoimidazole-4-carboxamide riboside, and N6-mercaptopurine riboside. Evidence for involvement of amp-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 23758-63.
256. Gauthier, M.S., et al., *AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance*. J Biol Chem, 2008. **283**(24): p. 16514-24.
257. Park, H.U., et al., *AMP-activated protein kinase promotes human prostate cancer cell growth and survival*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(4): p. 733-41.
258. Niida, H., et al., *Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells*. Cancer Sci. **101**(12): p. 2505-9.
259. Bester, A.C., et al., *Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development*. Cell. **145**(3): p. 435-46.
260. Nordlund, P. and P. Reichard, *Ribonucleotide reductases*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 681-706.
261. Thomas, C.B., J.C. Meade, and E.W. Holmes, *Aminoimidazole carboxamide ribonucleoside toxicity: a model for study of pyrimidine starvation*. J Cell Physiol, 1981. **107**(3): p. 335-44.
262. Lopez, J.M., et al., *5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in Jurkat cells, but the AMP-activated protein kinase is not involved*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 3): p. 1027-32.
263. Courbet, S., et al., *Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells*. Nature, 2008. **455**(7212): p. 557-60.
264. Anglana, M., et al., *Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing*. Cell, 2003. **114**(3): p. 385-94.